

· 实验研究 ·

刀豆蛋白 A 条件化培养基对体外培养兔角膜内皮细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶的作用

邢咏新 张 林

Distribution and activity of Na⁺-K⁺-ATPase in cultured rabbit corneal endothelial cells with or without ConA-conditional cultured medium

Xing Yongxin, Zhang Lin. Tianjin Eye Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300020, China

Abstract Objective The activity of Na⁺-K⁺-ATPase on the corneal epithelial cells is an important index in evaluating the metabolism and function of cell. Na⁺-K⁺-ATPase play potential role in maintaining the transparency of cornea. Concanavalin A (ConA)-conditioned medium contain many types of cytokines and can promote the growth of cultured cells. The aim of this paper was to evaluate the distribution and activity of Na⁺-K⁺-ATPase in cultured corneal endothelial cells of rabbit with or without concanavalin A (ConA)-conditioned medium. **Methods** The corneal endothelial sheet and Descemet membrane was isolated from the healthy mature New Zealand albino rabbit eyes under the anatomic microscope and cultured in RPMI1640 medium containing 5, 10, 15 and 20 mL of ConA (10% ConA-activated spleen cells supernatant), 10 mL of fetal bovine serum (10%) and 60 mL of IMDM using mass culture method. A video system connected to the inverted phase-contrast microscope was used to observe the morphologic change of cultured cells. The activity of Na⁺-K⁺-ATPase on the cultured cells was evaluated with Bradford, trypan blue dyeing and ATPase reagent kit in the 5th, 7th and 10th day. The distribution of Na⁺-K⁺-ATPase on primarily cultured corneal endothelial cells was examined under the electron microscopic cytochemistry. **Results** By tearing corneal endothelial sheet and Descemet membrane, The corneal endothelial cells of rabbit were successfully cultured using mass cultivation. Na⁺-K⁺-ATPase showed the higher density on the surface of cellular membrane in ConA-conditioned supernatant group. Na⁺-K⁺-ATPase presented the highest activity in primarily cultured corneal endothelial cells in the 10th day, showing a significant differences in different time points ($P < 0.01$). **Conclusion** Activity of Na⁺-K⁺-ATPase in RCECs is highest at 7th to 10th day. Medium with ConA-conditioned can improve the activity of Na⁺-K⁺-ATPase in RCECs. The activity of Na⁺-K⁺-ATPase can be used to evaluate the function of cultured corneal endothelial cells.

Key words corneal endothelial cells; cell culture; concanavalin A; Na⁺-K⁺-ATPase

摘要 目的 研究刀豆蛋白 A (ConA) 条件化培养基对体外培养兔角膜内皮细胞膜表面 Na⁺-K⁺-ATP 酶的分布及其酶活性的影响。 **方法** 超微量 ATP 酶试剂盒测定原代培养兔角膜内皮细胞膜表面 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性, 并对 ConA 条件化培养基作用下不同生长周期 (5、7、10 d) 细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性进行测定; 免疫酶组织化学电镜下观察不同培养基作用下体外培养角膜内皮细胞膜表面 Na⁺-K⁺-ATP 酶的分布。 **结果** ConA 条件化培养基组兔角膜内皮细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性明显高于无 ConA 组 ($P < 0.01$), 原代细胞生长 7 ~ 10 d 时 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性最高 ($P < 0.01$)。单层兔角膜内皮细胞膜外侧可见 Na⁺-K⁺-ATP 酶阳性反应。在 ConA 条件化培养基处理组, 其阳性反应物较多、致密; 而在无 ConA 组则阳性反应物较少、疏松。 **结论** 体外原代培养角膜内皮细胞在 7 ~ 10 d 时, Na⁺-K⁺-ATP 酶活性最高。ConA 条件化培养基可提高兔角膜内皮细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性。

关键词 角膜内皮细胞; 细胞培养; 刀豆蛋白 A; Na⁺-K⁺-ATP 酶

分类号 R 772 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0182-05

角膜内皮细胞对于维持角膜透明性具有至关重要的作用。角膜内皮细胞通过角膜内皮细胞的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性,维持角膜内及房水内 Na^+ 梯度差,保持其透明性^[1]。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶存在于角膜内皮细胞膜上,其活性的大小是反映细胞能量代谢和功能的重要指标。任何导致角膜内皮细胞损害的因素,均能使这一屏障作用受损,从而导致角膜水肿,失去其透明性。刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 是一种植物凝集素,属于 T 细胞非特异性丝裂原,其活化大鼠或小鼠脾细胞后的条件上清液中含有多种细胞因子,如 IL-1、IL-2、IL-6、成纤维生长因子等^[2]。本研究首次采用 ConA 条件化培养基进行体外兔角膜内皮细胞培养,并使用 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶作为评价角膜内皮细胞活性的指标。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 眼球来源 健康成年新西兰白兔(西安交通大学医学院动物中心提供),雌雄不限,体重 1.5 ~ 2.0 kg,耳缘静脉空气栓塞处死后立即取出眼球,保存于 4 °C 湿房中。所摘取的眼球需结构完整、角膜透明、结膜囊无分泌物。在无菌条件下,剪除眼球周围结缔组织及球结膜后,用含庆大霉素 400 U/mL 的生理盐水多次冲洗并浸泡,置于 4 °C 冰箱中备用。

1.1.2 主要试剂及配制 RPMI1640 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物制品公司);L-谷氨酰胺(美国 Sigma 公司)。ConA 条件化上清液的制备:将大鼠脾脏制成单细胞悬液,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 IMDM 培养基(美国 Gibco 公司)调整细胞密度至 5×10^6 /mL,移入 24 孔细胞培养板内,每孔 2 mL,加入 ConA(美国 Sigma 公司)10 μL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),置于 5% CO_2 培养箱内孵育,培养 48 h,取出培养上清液,1 000 r/min 离心 10 min,通过葡聚糖凝胶 G-25 (sephadex G-25,美国 Sigma 公司)过柱,过滤除菌(0.22 μm),分装, -20 °C 储存备用。使用前加入 0.1 mol/L 的 α -甲基甘露糖(美国 Sigma 公司)以中和上清液中残留的 ConA 成分,本实验中 ConA 条件上清液由第四军医大学空医系细胞培养室提供;条件化培养基制备:每 100 mL RPMI1640 培养基中分别加入 5、10、15、20 mL ConA 条件化上清液,10 mL 胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司),60 mL IMDM 液,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$;考马斯蓝蛋白测定试剂盒、超微量 ATP 酶测试盒(南京建成生物工程研究所);噻唑蓝(美国 Sigma 公司)。D-Hanks 液按常规处

方配制,高压灭菌备用。

1.1.3 主要仪器设备 CO_2 培养箱(BNA-321D,日本 Toabai Espec 公司);倒置相差显微镜(美国 Bausch Lomb 公司);医用超净化工作台(苏州净化设备厂);高速离心机(北京医用离心机厂);721 分光光度计、细胞匀浆器(第四军医大学空医系细胞培养室提供);透射式电子显微镜(日本日立 H-600,西安交通大学医学院电镜室提供)。

1.2 方 法

1.2.1 后弹力层及内皮层揭取联合组织块法兔角膜内皮细胞原代培养的体外培养 在超净工作台内,将上述备用眼球置于无菌培养皿 D-Hanks 液中,在体视解剖显微镜下,于角膜缘内 1 mm 环形剪取角膜片,置于另一无菌培养皿中,内皮面向上,沿角膜片边缘揭取内皮细胞层,内皮面向上。将其切割成 1 mm \times 2 mm 的组织块,将组织块置于以 0.1% 明胶及胎牛血清预处理的无菌培养瓶中,内皮面向下,铺平展开组织块,放入 37 °C、5% CO_2 培养箱中贴壁 4 h 后,分别加入各组培养基,置于培养箱中继续孵育。72 h 后首次更换培养液,以后每隔 2 d 换液 1 次。

1.2.2 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力测定 将培养细胞消化、离心,弃上清,留下层细胞,用 4 °C 生理盐水制备成 10^5 个/ mm^3 细胞匀浆,即 10^5 个/ μL 细胞,再使用匀浆器在冰上进行破碎,制备细胞悬液备用。(1)使用考马斯亮蓝试剂盒测定细胞悬液中蛋白质质量浓度。按产品说明书加入所需试剂及样本,测吸光度值,并计算蛋白质质量浓度。蛋白质质量浓度 = (测定管吸光度值/标准管吸光度值) \times 标准管质量浓度。标准管质量浓度为 0.727 g/L。(2)取培养细胞,以 0.25% 胰蛋白酶消化(同传代培养操作),37 °C CO_2 培养箱中消化后将细胞悬液吸出 5 000 r/min 离心 30 s,取上清液 45 μL ,加入 5 μL 0.4% 台盼蓝溶液混匀,吸取 25 μL 细胞悬液分别加在血细胞计数板内,显微镜下计算平均细胞数 (n)。每组测 2 次,取其平均值。记录为 $n \times 10^5$ 个/mL 细胞。(3)按照超微量 ATP 酶测试盒说明书进行 ATP 酶检测,测定各管吸光度值,并计算 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力。细胞中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力 (U/ 10^5 个细胞) = [(测定管 OD 值 - 对照管 OD 值)/(标准管 OD 值 - 空白管 OD 值)] \times 标准管浓度 (0.1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) \times 6 \times 样本测试前稀释倍数 (200)/(每毫升细胞数/ 10^5)。

1.2.3 培养细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶免疫酶组织电镜观察 本实验部分由西安交通大学医学院电镜室协助完成。(1)选用汇合率为 70% ~ 80% 的培养兔角膜内皮单层细胞爬片(盖玻片),A 组为 RPMI1640 + 10% FBS

+10% ConA (处理组), B 组为 RPMI1640 + 10% FBS (对照组)。(2)4% 多聚甲醛 + 100 mmol/L 二甲基砷酸盐 + 8% 蔗糖混合液固定 10 min。(3)弃去固定液,以二甲基砷酸盐缓冲液浸洗 2 h。(4)置于预孵育液中(不加底物 P-NPP 的孵育液), [孵育液组成: 1.0 mmol/L Glycine-KOH buffer 2.5 mL pH 9.0, 1% lead citrate 融于 50 mmol/L KOH 4.0 mL, DMSO 2.5 mL, 100 mmol/L P-Nitropheny phosphate (P-NPP Hg salt) 1 mL, levamisole 6.02 mg pH 8.8], 室温孵育 15 min 后, 置入孵育液中, 37 °C 孵育 30 min。(5)孵育后, CaCO buffer 浸洗 30 min, 1% OsO₄ 后固定 30 min。(6) 0.1 mol/L 磷酸缓冲液浸洗 10 min, 乙醇梯度脱水, 30% 乙醇 8 min, 70% 乙醇 8 min × 2 次, 70% 乙醇醋酸双氧铀块染 2 h, 90% 乙醇 8 min × 2 次, 100% 乙醇 8 min × 3 次。(7) 环氧丙烷置换 10 min, 环氧树脂 Epon812 浸透、包埋, 聚合后半超薄切片 1 ~ 2 μm, 美蓝染色后, 光学显微镜下定位, 超薄切片进行超薄切片 50 ~ 70 nm, 醋酸铀、柠檬酸铅染色。(8)透射式电子显微镜下观察、照相。

1.3 统计学方法

所得数据采用 SPSS 11.0 进行统计学分析, 各组数据经 Levene 检验证实方差齐, 3 个细胞生长周期原代角膜内皮细胞膜上 Na⁺-K⁺-ATPase 活性的比较采用单因素方差分析, 各周期的两两比较采用 SNK-q 检验。

ConA 和无 ConA 培养组细胞计数和原代角膜内皮细胞膜上 Na⁺-K⁺-ATPase 活性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 ConA 条件化培养基下不同生长周期原代角膜内皮细

胞 Na⁺-K⁺-ATPase 活性

ConA 条件化上清培养基原代角膜内皮细胞 5、7、10 d 时 Na⁺-K⁺-ATPase 活性分别为 (0.135 ± 0.006)、(0.370 ± 0.122)、(0.633 ± 0.385) U/10⁵ 个细胞, 各组比较差异均有统计学意义 (P < 0.01) (图 1, 2)。

2.2 不同培养基原代培养角膜内皮细胞 Na⁺-K⁺-ATPase 活性

本实验选择原代培养汇合率达 80% 的细胞进行分组测定, 结果显示使用 ConA 条件化培养基的原代细胞, 在汇合率达 80% 左右时, 其细胞数及 Na⁺-K⁺-ATPase 活性均明显高于无 ConA 组, 差异均有统计学意义 (P < 0.01) (表 1, 图 3)。

表 1 不同培养基原代角膜内皮细胞 Na⁺-K⁺-ATPase 活性和细胞计数比较 (x̄ ± s)

Table 1 Na⁺-K⁺-ATPase activity and cell counting in different cultured medium groups (x̄ ± s)

Group	Cell count(× 10 ⁵)	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase activity(U/10 ⁵ cells)
With ConA	1.994 ± 0.736	0.722 ± 0.111
Without ConA	0.311 ± 0.092	0.295 ± 0.040
P	0.000	0.000

(Student's t test)

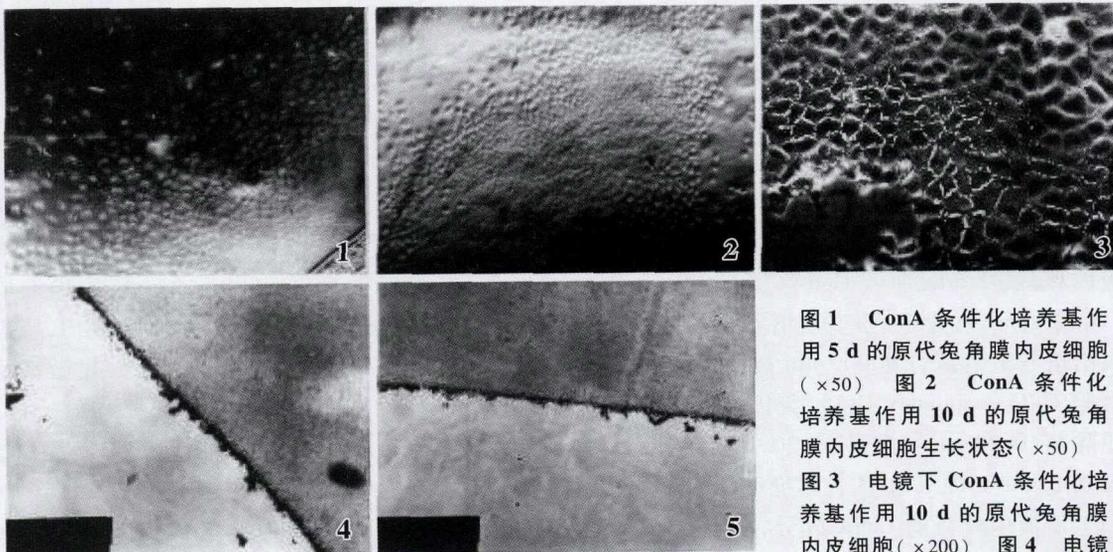


图 1 ConA 条件化培养基作用 5 d 的原代兔角膜内皮细胞 (×50) 图 2 ConA 条件化培养基作用 10 d 的原代兔角膜内皮细胞生长状态 (×50) 图 3 电镜下 ConA 条件化培养基作用 10 d 的原代兔角膜内皮细胞 (×200) 图 4 电镜下 ConA 培养组 Na⁺-K⁺-ATPase 在培养的细胞膜上的分布 (×10 000) 图 5 电镜下无 ConA 培养组 Na⁺-K⁺-ATPase 在培养的细胞膜上的分布 (×10 000)

下 ConA 培养组 Na⁺-K⁺-ATPase 在培养的细胞膜上的分布 (×10 000) 图 5 电镜下无 ConA 培养组 Na⁺-K⁺-ATPase 在培养的细胞膜上的分布 (×10 000)

Fig. 1 The growth statue of endothelial cells in the 5th day after primarily cultured with ConA-conditioned medium (×50) Fig. 2 The growth statue of endothelial cells in the 10th day after primarily cultured with ConA-conditioned medium (×50) Fig. 3 The growth statue of endothelial cells in the 10th day after primarily cultured with ConA-conditioned medium under the electron microscope (×200) Fig. 4 The distribution of Na⁺-K⁺-ATPase on the cellular membrane in ConA-conditioned medium group under the electron microscopy (×10 000) Fig. 5 The distribution of Na⁺-K⁺-ATPase on the cellular membrane in non-ConA-conditioned medium group under the electron microscopy (×10 000)

2.3 不同生长状态下 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶免疫组织电镜结果

形成单层的原代培养角膜内皮细胞基底膜外侧可见黑色电子密度黑色磷酸铅颗粒沉淀,呈 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶阳性反应。在 ConA 条件化培养基处理组,其阳性反应物较多、致密(图 4);而在无 ConA 组则阳性反应物较少、疏松(图 5)。

3 讨论

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,又称钠泵,是一种膜转运蛋白,通过水解 ATP 获得能量,具有产生和维持细胞膜电位、调节细胞容积、维持细胞膜内外渗透压的平衡、调节细胞 Ca^{2+} 浓度及促进物质吸收等功能。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的大小是反映细胞能量代谢和功能的重要指标。ATP 酶可分解 ATP 产生 ADP 及无机磷,因此测定无机磷的量可以判断 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的高低^[1]。

角膜内皮细胞对角膜的脱水状态的维持是一种主动转运过程,是一种消耗能量的生理过程。 Na^+ 穿过细胞膜的主动转运,通常能够被哇巴因所抑制,这一抑制过程是通过抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性来实现的,可在适宜的 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 等离子比例的情况下被水解,是细胞膜主动转运过程中的关键酶。因为组织固定并不抑制这种酶,因此应用组织化学技术可以显示出该酶的所在位置^[1-3]。

研究发现角膜内皮细胞的细胞膜上存在 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,酶活性主要位于细胞两侧的细胞膜,即位于相邻部位的细胞膜上,在其面向前房和 Descemet 膜的细胞膜部分,并未见到 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性^[4]。但是近年来一些学者在前房和 Descemet 膜的细胞膜面也观察到了该酶的存在^[5]。

近年来研究者又检测到角膜内皮细胞和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶有关的泵位点的密度^[4]。每平方毫米的细胞表面约有 20.7 f mole 哇巴因标记的细胞膜,相当于每个细胞有 3×10^6 个泵位点。从而从组织化学方面进一步证实了角膜内皮细胞的液体主动转运作用。

对体外培养牛角膜内皮细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的检测显示,原代细胞在 5 d 时活性较低,约为 0.05 U,10 d 时增长达 0.22 U,传代细胞在形成单层细胞时, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性较原代细胞明显增高,为 0.22 ~ 0.52 U^[5]。Whikehart 等^[7]认为传代培养细胞的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶受体变化,反馈抑制作用或遗传的不稳定性导致酶活性的改变,将甘露醇加入培养基中,可明显抑制

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的作用,这一机制不同于以往研究观察到的葡萄糖对该酶的抑制作用。Guggenheim 等^[8]使用小鼠的单克隆抗体测定牛角膜内皮细胞的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,Western Blot 证实相对分子量为 100 000 及 50 000 的蛋白质存在,与 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶亚基相一致,免疫细胞化学研究证实在角膜内皮细胞膜的两侧存在 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,该研究不同于以往研究中所述的仅在细胞外侧存在此酶的结果。祝素文等^[9]也观察到体外培养的兔角膜内皮细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的分布情况。本研究结果显示,在体外培养的原代角膜内皮细胞基底膜面具有 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性分布,和相关文献报道一致^[4,6,8]。

ConA 是一种植物凝集素,属于 T 细胞非特异性丝裂原,能选择性地与 α -D-甘露糖残基结合。体内研究发现 ConA 能与细胞表面受体结合,从而活化细胞,诱导 IL-2 的生成和 T 淋巴细胞的增生反应。其酪蛋白酶解产物等物质可以激活细胞内的酪氨酸激酶,通过 G 蛋白的介导,活化第二信使,进而活化一系列信号转导系统,最终传递到细胞核内,启动 DNA 的复制,促进细胞增生。体外实验也证实,ConA 可作为有丝分裂原刺激 T 淋巴细胞表达多种细胞因子^[10]。ConA 诱导小鼠/大鼠脾脏淋巴细胞上清(ConA 条件上清)中含有多种细胞因子,如 IL-1、IL-2、IL-6、成纤维细胞生长因子等,也可能包含有多种免疫源性神经肽类激素及其他物质,可活化体内的神经内分泌免疫调节系统,体外实验可不同程度地直接刺激下丘脑、垂体和肾上腺组织分泌促皮质素释放激素、促肾上腺皮质激素、皮质酮等神经肽类激素和皮质酮^[2,11]。

本实验首次使用 ConA 活化脾细胞培养上清液制成 ConA 条件化培养基,进行家兔角膜内皮细胞的培养。研究表明,经过 ConA 活化脾细胞产生的条件化上清液,具有促进培养兔角膜内皮细胞生长的作用。其原因可能与 ConA 的有丝分裂效应有关。ConA 活化脾细胞后分泌的多种生物活性细胞因子,可明显促细胞增生。脾细胞与 ConA 共同孵育 24 ~ 48 h,其培养上清液中细胞因子含量达最高水平。本实验取此期的上清液(最佳浓度为 10% ~ 15%)加入 RPMI1640 培养基中,制成 ConA 条件化培养基,进行兔角膜内皮细胞培养,可以缩短细胞培养周期,并同时保持细胞活性。因此可以将 ConA 活化脾细胞的条件上清液作为促进角膜内皮细胞生长的辅佐剂。

本实验结果显示在 ConA 条件化培养基作用下,原代角膜内皮细胞生长 10 d 时,其 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性较 5 d 时大约升高 4 倍。原代培养初期,尚未建立

良好的细胞连接,与汇合期相比细胞变异较大,因此 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性较差。当细胞生长至 10 d 左右时,细胞大部汇合,汇合率接近 80%,此时角膜内皮细胞形成较好的单层细胞,Na⁺-K⁺-ATP 酶活性明显升高。

本实验结果中 ConA 条件化培养基作用下的角膜内皮细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性无论从定量检测或免疫组织化学电镜检测,都与无 ConA 组具有显著性差异。ConA 条件化培养基中含有多种促有丝分裂成分,因此具有促细胞增生作用。在形成单层细胞时,其细胞连接形成较好,细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性较高。本实验结果从另一方面证明 ConA 条件化培养基可以作为良好的角膜内皮细胞培养辅助剂。但 ConA 条件化培养基增加 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的机制有待进一步研究。

以往的研究中,对于角膜内皮细胞的检测仅限于形态学的检测,对于细胞功能的检测方法较少,本实验中采用 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性定量及免疫组织化学(电镜)检测,对于今后进行角膜内皮细胞移植时,细胞的筛选、细胞的功能评价以及细胞移植后功能的重建等研究具有重要意义。

参考文献

(收稿:2008-03-18 修回:2008-11-23)
(本文编辑:刘 艳)

1 阎洪禄,于秀敏,主编.眼生理学[M].北京:人民出版社,2001:

19-31
2 张萃,柳志辉. ConA 诱导小鼠淋巴细胞上清对下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. 中国病理生理杂志,1999,15(4):318-320
3 Fischbarg J. Fluid and electrolyte transport across coeneal endothelium [J]. Curr Topics Eye Res,1984,4:201
4 Geroski DH, Edelhauser HF. The quantitation of Na/K ATPase pump sites in the rabbit corneal endothelium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984,225:1056
5 Whikert DR, Montgomery B, Wells JD. Age as a function of ATPase activity in cultured corneal endothelial cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,1989,30:335-338
6 Crawford KM, Ernst SA, Meyer RF, et al. Na-K-ATPase pump sites in cultured bovine corneal endothelium of varying cell density at confluence [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,1995,36(7):1317-1326
7 Whikehart DR, Angelos P, Montgomery B. Effects of mannitol on cultured corneal endothelial cell Na-K-ATPase activity [J]. Cornea,1995,14(3): 295-299
8 Guggenheim JA, Hodson SA. Localization of Na (+)/K (+)-ATPase in the bovine corneal endothelium [J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 19(2):127-134
9 祝素文,刘冬娟,刘宇宁,等.兔角膜内皮细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶的电镜酶细胞化学观察[J].解剖科学进展,2003,9(2):151-154
10 Fan T, Zhao J, Fu Y, et al. Establishment of a novel corneal endothelial cell line from domestic rabbit. Oryctolagus curiculus [J]. Sci China Series C- Life Sci,2007,50(2):161-169
11 Ganguly T, Badheka LP, Saninis KB. Immunomodulatory effect of Tylophora indica on ConA induced lymphoproliferation [J]. Phytomedicine, 2001,8:431-444

· 临床经验 ·

原发性闭角型青光眼睫状体厚度和前房深度的关系

盛文燕 张惠成 胡勇平

应用超声生物显微镜(ultrasound biomicroscopy,UBM)可观察眼前节结构,了解原发性闭角型青光眼(primary angle-closure glaucoma,PACG)的眼前节解剖结构特点^[1-2]。PACG 的发病机制与角膜小、前房浅、晶状体厚、眼轴短及晶状体位置偏前等解剖因素相关,有学者提出睫状突肿胀、睫状体位置偏前是 PACG 的可能发病因素^[3]。该研究主要关注的是 PACG 与房角关闭和睫状体厚度的特点及其与前房深度的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入标准和排除标准房角关闭组选择前房浅、眼压升高同时伴有房角虹膜前粘连,房角镜下发现房窄角 N2~N4(Scheie 分级)且无青光眼性视神经和视野改变者 16 例(16 眼)。PACG 组选择眼压升高时房角镜下检查发现有房角关闭,同时检眼镜检查有视盘和/或视网膜神经纤维厚度改变,

视野检查有青光眼改变者共 12 例 12 眼。对照组 20 人随机选择年龄、性别均与病例组相匹配的正常房角眼者,裂隙灯显微镜下检查仅有晶状体混浊,无其他眼部疾病。房角关闭、PACG 组分别与对照组的年龄、性别经 χ^2 检验差异无统计学意义 ($P>0.05$)。有瞳孔大小明显异常、瞳孔变形及粘连者;角膜等屈光介质明显混浊影响内眼检查者;屈光度不正 3.0 D 以上者。

1.2 方法 所有患者根据病史、裂隙灯显微镜检查、眼压、眼底、视野及房角检查确定诊断。参阅 Pavlin 等^[1]的标准进行 UBM 测量:前房深度(ACD)、距巩膜突 500 μ m 处房角开放距离(AOD 500)和房角开放距离(AOD 750)、距巩膜突 500 μ m 处房角开放度数(AA 500)和房角开放度数(AA 750)。参阅 Tskashi 等^[4]的方法分别测量巩膜突后 1、2、3 mm 位置的睫状体厚度,依次记录为 T1、T2 和 T3。采用美国 Paradigm Medical Industries P40 型超声生物显微镜,换能器频率 50 MHz,探查深度 4~5 mm。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计学软件。各组测定值

作者单位:310003 杭州市红十字会医院(盛文燕);310006 杭州市第一人民医院眼科(张惠成、胡勇平)
通讯作者:张惠成(Email:zhczhl@163.com)