

转化生长因子 β_2 对角膜内皮细胞增生的影响

刘 洋 张明昌 黄渝侃 姜冬玲 张红旭

Inhibitory effect of transforming growth factor- β_2 on the proliferation of bovine corneal endothelial cells in vitro

Liu Yang, Zhang Mingchang, Huang Yukan, Jiang Dongling, Zhang Hongxu. Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract Objective Human corneal endothelial cell has little capacity of cell division. Endothelial repair is limited to enlargement and sliding of existing cells, and failure of endothelial function leads to corneal edema. Present study was to observe the inhibitory effect of transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2) on the bovine corneal endothelial cells. **Methods** The corneal endothelial cells were isolated from novel bovine and digested and cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum. The second or the third passages of the bovine corneal endothelial cells were treated with different concentrations of TGF- β_2 (0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/L}$). The biologic activities of TGF- β_2 in different time period and different doses of TGF- β_2 group were detected with CCK-8. The flow cytometer was used to evaluate the cell cycle of negative control group and TGF- β_2 -treated groups. **Results** The cultured cells presented the confluence in the 72nd hour. The A value of the cultured cells by CCK-8 assay was significantly decreased in 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/L}$ groups. The A value was most significantly decreased in all groups in the 48th hour. The inhibition effects were most significant in 0.1 $\mu\text{g/L}$ and 1 $\mu\text{g/L}$ groups in the same time group ($F_{\text{group}} = 17.916, P < 0.05; F_{\text{time}} = 22.551, P < 0.05$). The cell cycle of the negative control group and TGF- β_2 groups were examined by the Flow cytometer (FCM) 48 hours after TGF- β_2 treatment. G_0 cells in 0.1 $\mu\text{g/L}$ and 1 $\mu\text{g/L}$ TGF- β_2 groups were significantly increased in comparison with negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion** TGF- β_2 can inhibit the proliferation of bovine corneal endothelial cells from 24 through 72 hours at the concentration of 0.1 $\mu\text{g/L}$ and 1 $\mu\text{g/L}$.

Key words TGF- β_2 ; corneal endothelial cell; cell culture; flow cytometer

摘要 目的 体外培养角膜内皮细胞(CECs),观察不同质量浓度的外源性转化生长因子 β_2 (TGF- β_2) 对牛 CECs 的增生抑制作用。 **方法** 0.1、1、10、100 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 作用于体外培养的牛 CECs,于 24、48、72 h 观察不同质量浓度的 TGF- β_2 对牛 CECs 的影响。采用 CCK-8 检测法测定各孔吸光度(A 值),采用流式细胞检测仪对各组细胞周期进行检测。 **结果** 0.1、1、10 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 作用后各时间点,均能使牛 CECs 的吸光度发生改变。在同一时间点,0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 抑制效果最为显著。各质量浓度的 TGF- β_2 对牛 CECs 作用 48 h,其吸光度改变最明显。48 h 时,0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 对牛 CECs 的增生抑制作用明显。各质量浓度组作用 48 h 后,0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 组牛 CECs 的 G_0 周期细胞所占比例与阴性对照组比较,差异均有统计学意义,而 10 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 组的牛 CECs 的 G_0 期细胞百分比与阴性对照组比较,差异均无统计学意义。 **结论** 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 作用 24、48、72 h 对牛 CECs 均具有明显的增生抑制作用。

关键词 TGF- β_2 ; 角膜内皮细胞; 细胞培养; 流式细胞技术

分类号 R 772.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)06-0502-04

角膜内皮细胞 (corneal endothelial cell, CECs) 形态的完整和功能的健全,在维持角膜的正常功能,尤其是角膜的透明性方面,起着重要的作用^[1]。人 CECs 在胚胎期具有分裂增生能力,在出生后将停止增生^[2-4]。

人角膜内皮对于细胞的损失只能通过周边细胞的扩大和移行而不是通过细胞增生来补偿^[3]。所有眼前节的手术,均将损伤部分 CECs,导致细胞密度下降。如果损失达到一定程度,超过周边细胞的代偿能力,即可发生角膜内皮失代偿,引起角膜水肿,严重者可发生大泡性角膜病变。转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 家族是一组调节细胞生长和分化的蛋

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科

通讯作者:张明昌 (Email: mingchangzhang@hotmail.com)

白质^[5-6],其中 TGF- β_2 是人眼房水中 TGF- β 的主要亚型^[7]。有研究证实,内源性和外源性的 TGF- β_2 对 CECs 的增生均有抑制作用^[8]。而 TGF- β_2 对细胞生长的抑制作用主要是阻止细胞进入 S 期,使细胞停滞在 G₀/S 的交界。本实验即是研究不同质量浓度的 TGF- β_2 在不同作用时间下,对牛 CECs 增生抑制的影响,为研究对 CECs 增生抑制的影响因素,寻找阻断影响 CECs 增生影响因素的药物,提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源 新生小牛来自武汉市吴家山奶牛场,于宰杀后立即摘除眼球,用无菌的 1:2 000 的庆大霉素及生理盐水混合溶液冲洗后,于 2 h 内用冰瓶运回进行组织培养。

1.1.2 主要试剂及仪器 TGF- β_2 (武汉贝尔生物技术有限公司);胎牛血清、DMEM 培养基(美国 Gbico 公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);CCK-8 试剂盒 (cell counting Kit-8)、碘化丙啶 (pro-pidium iodide, PI) (上海同仁化学研究所);Elx-800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);流式细胞仪(Becton Dickinson FACS Calibur);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 新生小牛 CECs 的原代培养及传代 将新鲜牛眼球取出,剪除结膜及周围结缔组织后,再次用无菌的 1:2 000 的庆大霉素及生理盐水混合溶液浸泡 30 min 后移入无菌操作台,用 D-Hanks 液漂洗 2 次^[9]。无菌条件下去除角膜前板层(避免上皮细胞混入)。距角膜缘内 1 mm 取下全周角膜片,内皮面向上置于眼杯中。用 D-Hanks 液轻轻漂洗 2 次。用微量加样器吸取 2.5 g/L 胰蛋白酶与 0.2 g/L EDTA 溶液的混合液 25 μ L 于角膜内皮面上,使内皮面充分接触到混合消化液。将眼杯放入 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 的培养箱内孵育 10 min,用微量加样器将上述混合液吸出,再加入 1 mL 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液,中止消化。用微量加样器枪头在角膜上轻轻刮除内皮细胞。随后将细胞悬液吸出,加入 1.5 mL EP 管中,1 200 r/min 离心 5 min 后,弃去上清^[10]。再加入 1 mL 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液,重新悬浮细胞,将细胞悬液加入 25 mL 培养瓶中。再向瓶中加入一定量含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液至刚好覆盖瓶底。加盖后将培养瓶放入 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂、湿度为 95% 的培养箱内孵育。待原代细胞长满瓶底后(72 h),按 1:3 比例,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代。倒置相差显微

镜观察原代培养的牛 CECs 细胞形态学特征,并拍照。

1.2.2 CCK-8 法^[11]测定外源性 TGF- β_2 对牛 CECs 增生抑制的影响 取第 3~4 代 CECs 细胞悬液,用 0.25% 胰蛋白酶消化制备成细胞悬液。调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,接种于一次性 96 孔板中。将细胞分为 6 个组,分别为空白对照组、阴性对照组及 4 个实验组,每组设 4 个复孔。空白对照组每孔只加 100 μ L 不含细胞的培养液,其余 5 个组每孔加入 100 μ L 细胞悬液。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 24 h,弃去培养液,每孔加入不含胎牛血清的 DMEM 培养液各 200 μ L,继续培养 24 h,使细胞同步化。弃去培养液,空白对照组和阴性对照组加入不含胎牛血清的 DMEM 培养液 200 μ L,实验组中分别加入含不同终质量浓度 TGF- β_2 分别为 0.1、1、10、100 μ g/L 的不含胎牛血清的 DMEM 培养液 200 μ L。培养 48 h 后,每孔加入 CCK-8 10 μ L/孔,于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续孵育 3 h 后,用 Elx800 酶标仪测吸光度(A 值)。测定各孔的吸光度(A 值)后,根据公式算出各质量浓度 TGF- β_2 对牛 CECs 的增生的抑制率。细胞抑制率% = 1 - (实验组吸光度 - 空白对照组吸光度) / (阴性对照组吸光度 - 空白对照组吸光度) \times 100%。

1.2.3 流式细胞仪^[9]检测细胞周期 准备第 3 代牛 CECs 共 10 瓶,于 50 mL 的培养瓶中即将长满瓶底的时候,吸出原有培养液,其中 8 瓶分别加入含有 0.1、1、10、100 μ g/L 的 TGF- β_2 的培养液,另 2 瓶设置为阴性对照组,只加不含 TGF- β_2 的 DMEM 培养液。培养 48 h 后,吸出瓶内液体,用 D-Hanks 液洗 2 遍,加入少量的 0.25% 胰蛋白酶。将培养瓶置于倒置显微镜下观察,见细胞间隙变大、细胞变圆时,弃去胰蛋白酶并以 PBS 液洗 2 遍,加入适量磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)充分吹打,制备成单细胞悬液。将单细胞悬液移入离心管,1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清,复加 PBS 液,重新悬浮细胞成单细胞悬液,迅速注入 4 $^{\circ}$ C 的 70% 乙醇, -20 $^{\circ}$ C 过夜。将冰乙醇细胞悬液离心后弃去乙醇,以 PBS 溶液清洗 2 次,调整细胞密度为 10^5 个/mL,移入流式管内离心。弃去上清,加入 PI 100 μ L 染色,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中。20 min 后,用流式细胞仪分析细胞周期。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行分析。CCK-8 检测法测出 TGF- β_2 对牛 CECs 增生的抑制率以 % 表达,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同质量浓度 TGF- β_2 作用不同时间后细胞 CCK-8 吸光度(A 值)均值的总体比较采用两因素方差分析,组间的多重比较采用

SNK-*q* 检验。流式细胞仪检测法检测不同浓度的 TGF-β₂ 作用下 G₀ 期细胞百分比比较采用 χ² 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牛 CECs 的原代及传代培养

8 h 时可见细胞贴壁,细胞生长旺盛、轮廓清晰、胞体透亮。72 h 后,细胞基本长满瓶底,大部分细胞呈融合状态,细胞轮廓欠清晰,呈多边形,胞质清亮。

2.2 外源性 TGF-β₂ 对牛 CECs 增生抑制的影响

0.1、1、10 μg/L 的 TGF-β₂ 作用后各时间点,均能使牛 CECs 的吸光度发生改变。在同一时间点,0.1 μg/L、1 μg/L 的 TGF-β₂ 抑制效果最为显著。各质量浓度的 TGF-β₂ 对牛 CECs 作用 48 h,其吸光度改变最明显(表 1)。48 h 时,0.1 μg/L、1 μg/L 的 TGF-β₂ 对牛 CECs 的增生抑制作用明显(表 2)。

差异均无统计学意义(P > 0.05)(表 3)。

表 3 流式细胞检测仪结果分析(%)
Table 3 The result of flow cytometer analysis(%)

TGF-β ₂ (μg/L)	Cell rate of G ₀ phase
0	—
0.1	49.56
1	53.37
10	37.56
100	39.21

3 讨论

TGF-β 家族是一组调节细胞生长和分化的蛋白质家族,目前认为 TGF-β 包括 TGF-β₁、TGF-β₂、TGF-β₃、TGF-β₄ 4 个亚型。TGF-β 在体内外具有广泛的生物学功能,包括调控细胞生长、调节细胞表型、抑制肿瘤生长等作用。TGF-β₂ 是人眼房水中 TGF-β 的主要亚型,质量浓度为 0.41 ~ 2.24 ng/mL^[12]。体外实验证实,外源性和内源性的 TGF-β₂ 对 CECs 的增生均有抑制作用。而 TGF-β₂ 对细胞生长的抑制作用主要是阻止细胞进入 S 期,使细胞停滞在 G₀/S 的交界。

细胞周期是指连续分裂细胞的有丝分裂从一次分裂结束到下一次分裂完成所经历的整个连续过程。完整的细胞周期由 G₀/G₁ 期、S 期、G₂ 期和 M 期构成,流式细胞仪可测定并计算出 1 个群体中各时期细胞的比例,以了解细胞的增生活性。对细胞周期规律的研究可深入了解其各自的生长特性、受外界因素作用的特点和影响程度。本研究流式细胞仪分析表明,在体外不同质量浓度的 TGF-β₂ 作用下,G₀/G₁ 期细胞百分比升高。说明 TGF-β₂ 对体外培养的牛 CECs 具有抑制增生的作用。

本研究通过 CCK-8 检测法测定外源性 TGF-β₂ 对牛 CECs 增生抑制的影响。CCK-8 利用 Dojindo(日本同仁公司)的四唑盐——WST-8 [2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐],它在电子载体 1-Methoxy PMS 存在的情况下能够被还原成水溶性的甲臞染料。CCK-8 法是用于测定细胞增生或毒性试验中活细胞数目的一种高灵敏度、无放射性的比色检测法。WST-8 被细胞内脱氢酶生物还原后生成的橙色甲臞染料能够溶解在组织培养基中,生成的甲臞量与活细胞数量成正比。WST-8 法检测细胞增生实验的灵敏度较其他四唑盐如 MTT、XTT、MTS 或 WST-1 高。检测结果发现,0.1、1、10 μg/L 的 TGF-β₂ 作用后 24、48、72 h,均能使牛 CECs 的吸光度发生改

表 1 TGF-β₂ 处理后牛 CECs 的吸光度(̄x ± s, A 值)

Table 1 The optic absorbance (A value) of bovine CECs in different treating time of TGF-β₂ (̄x ± s, A value)

Concentration (μmol/L)	A value of bovine CECs in different time		
	24 h	48 h	72 h
0	0.826 ± 0.005	0.665 ± 0.031	0.912 ± 0.010
0.1	0.492 ± 0.009 ^b	0.400 ± 0.010 ^{bch}	0.529 ± 0.011 ^b
1.0	0.519 ± 0.008 ^b	0.391 ± 0.007 ^{bh}	0.604 ± 0.008 ^b
10	0.608 ± 0.007 ^{bc}	0.560 ± 0.006 ^{bch}	0.684 ± 0.017 ^{bch}
100	0.646 ± 0.010 ^c	0.580 ± 0.006 ^b	0.806 ± 0.012 ^c

F_{dosage} = 17.916, P < 0.05; F_{time} = 22.551, P < 0.05; ^bP < 0.05 vs respective 0 concentration group; ^cP < 0.05; intergroup comparison (dosage); ^bP < 0.05; intergroup comparison (time) (Two-way ANOVA, SNK-*q* test)

表 2 TGF-β₂ 对牛 CECs 增生的抑制率(%)

Table 2 The inhibitory rate of TGF-β₂ on proliferation of bovine CECs (%)

Concentration (μmol/L)	Inhibitory rate of TGF-β ₂ on proliferation of bovine CECs in different time		
	24 h	48 h	72 h
0	—	—	—
0.1	62.45	63.27	59.02
1.0	57.25	65.22	47.50
10	40.73	23.78	35.10
100	33.70	19.25	16.22

2.3 外源性 TGF-β₂ 对细胞周期的影响

各质量浓度组作用 48 h 后,0.1 μg/L、1 μg/L 组牛 CECs 的 G₀ 期细胞所占比例与阴性对照组比较,差异均有统计学意义(P < 0.05),而 10 μg/L、100 μg/L 组的牛 CECs 的 G₀ 期细胞百分比与阴性对照组比较,

变。100 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 作用后,细胞的吸光度与阴性对照组相比,无明显改变。在同一时间点,0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 作用后,抑制作用明显。各质量浓度的 TGF- β_2 对牛 CECs 作用 48 h 时,吸光度改变最明显。48 h 时,0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 对牛 CECs 增生抑制作用明显 ($P < 0.05$),0.1 $\mu\text{g/L}$ 组抑制率为 63.27%,1 $\mu\text{g/L}$ 组抑制率为 65.22%。流式细胞仪检测细胞周期的结果表明,各质量浓度组作用 48 h 后,0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 组牛 CECs 的 G_0 期细胞所占比例与阴性对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 10 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 组牛 CECs 的 G_0 期细胞百分比与阴性对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。因此,可以认为,0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 对牛 CECs 的增生起抑制作用,10 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 ,对细胞的抑制作用没有低质量浓度组作用明显。

本研究结果以牛 CECs 为研究对象,研究外源性 TGF- β_2 不同质量浓度组在不同时间段对其增生抑制的影响。利用 CCK-8 酶标技术检测法和流式细胞检测法发现,在 24 ~ 72 h,0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_2 作用后,对牛 CECs 的增生起抑制作用。有研究表明,TGF- β_2 阻止 CECs 进入 S 期主要是通过 Smad 蛋白介导的胞内信号通路作用于 CECs 的细胞周期,而 CDK4 和 p27 可能是主要的靶蛋白^[13-14]。本研究为今后对 CECs 增生抑制影响因素的分子水平相关因素的研究提供了依据。

参考文献

- 1 刘祖国. 眼表疾病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:37
- 2 van Horn DL, Hyndiuk RA. Endothelial wound repair in primate cornea [J]. Exp Eye Res, 1975, 21: 113 - 124
- 3 Treffers WF. Human corneal endothelial wound repair in vitro and in vivo [J]. Ophthalmology, 1982, 89: 605 - 613
- 4 Ignatz RA, Massague J. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- β action[J]. Cell, 1987, 51(2): 189 - 197
- 5 胡晓琴,袁进,陈家祺,等. rhTGF- β_1 及转染 TGF- β_1 基因对兔角膜内皮细胞增殖的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(5): 915 - 919
- 6 陈蕾,邸大琳,崔为发,等. 转化生长因子- β 作用研究进展[J]. 医学理论与实践, 2006, 19(4): 400 - 402
- 7 Jampel HD, Roche N, Stark WJ, et al. Transforming growth factor-beta in human aqueous humor[J]. J Curr Eye Res, 1990, 9(10): 963 - 969
- 8 Chen K, Harris DL, Joyce NC. TGF-beta2 in aqueous humor suppresses S-phase entry in cultured corneal endothelial cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40: 2513 - 2519
- 9 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 北京:世界图书出版公司,2004: 44 - 368
- 10 胡晓琴,袁进,陈家祺,等. 角膜内皮细胞改良培养技术的初步探讨 [J] 眼科研究, 2008, 26(5): 321 - 325
- 11 何春艳,周琳婷,陈延,等. 采用可溶性噻唑盐 WST-8 检测细胞病变 [J]. 中国生物制品学杂志, 2004, 17(6): 405 - 407
- 12 Cousins SW, McCabe MM, Danielpour D. Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32: 2201 - 2211
- 13 Kim TY, Kim WI, Smith RE, et al. Differential activity of TGF-beta2 on the expression of p27Kip1 and Cdk4 in actively cycling and contact inhibited rabbit corneal endothelial cells [J]. Mol Vis, 2001, 7: 261 - 270
- 14 Funaki T, Nakao A. Smad7 suppresses the inhibition effect of TGF-beta2 on corneal endothelial cell proliferation and accelerates corneal endothelial wound closure in vitro [J]. Cornea, 2003, 22(2): 153 - 159

(收稿:2008-07-20 修回:2009-04-16)

(本文编辑:高红)

· 临床经验 ·

白内障小切口非超声乳化与超声乳化手术对角膜内皮细胞的影响

刘晓玲 刘彦才 缪爱红 梁仲琪

为探讨白内障不同手术方式对角膜内皮细胞的影响,对我院年龄相关性白内障患者 65 例(72 眼)患者术前术后角膜内皮细胞计数、六角形细胞比例及角膜水肿情况进行比较分析,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2007 年 5 月—2008 年 5 月在我院眼科行白内障手术的 100 例患者的病历资料,其中 65 例(72 眼)临床资料完整,均无青光眼、葡萄膜炎、外伤等影响角膜内皮的眼病。其中 24 例(26 眼)行小切口非超声乳化白内障摘出术,晶状体核硬度 III ~ IV 级,年龄(73 \pm 5)岁;41 例(46 眼)行超声乳化白内障摘出术,晶状体核硬度 II ~ III 级,年龄(67 \pm 7)岁。

1.2 手术方法 非超声乳化组:术前 3 d 点抗生素滴眼液,术前托吡酰胺滴眼液散瞳,2%利多卡因眼球周围注射麻醉,在角膜缘 11:00 处与角膜缘反方向弧形板层切开巩膜 5.5 mm(巩膜厚度 1/2),其顶点距角膜缘 2 mm,向前分离达透明角膜缘内 1 mm 穿刺至前房,前房注入黏弹剂,环形撕开晶状体前囊,水分离晶状体核及皮质,扩大切口至 5.5 ~ 6.0 mm,必要时选择 3:00、6:00、9:00、12:00 处扩大前囊膜口,旋转晶状体核至前房,在晶状体核前方及后方注入透明质酸钠,将晶状体圈伸入晶状体核后将核娩出(核大硬者机器碎核后娩出),注吸残余皮质,植入人工晶状体于囊袋内,冲洗出黏弹剂及残余皮质,检查巩膜切口密闭不漏水。超声乳化组:术前处理及巩膜切口同非超声乳化组,原位超声乳化吸出晶状体核,清除皮质扩大切口至 5.5 mm(折叠晶状体不扩大切口),植入人工晶状体于囊袋内,冲洗出黏弹剂及残余皮质,检查巩膜切口密闭不漏水。

1.3 角膜内皮细胞的观察 均采用非接触角膜内皮显微镜于

作者单位:063001 唐山开滦医院眼科(刘晓玲、梁仲琪);063001 唐山眼科医院(刘彦才);063001 唐山工人医院眼科(缪爱红)

通讯作者:刘晓玲 (Email: lx1701125@163.com)