

# 玻璃体切割术后兔晶状体纤维细胞凋亡的研究

温莹 毕宏生 崔彦 刘冬梅 解孝锋 俞超

## Experimental research on apoptosis of lens fiber cells after vitrectomy in rabbit

Wen Ying, Bi Hongsheng, Cui Yan, Liu Dongmei, Xie Xiaofeng, Yu Chao. Ophthalmic Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan Shierming Eye Hospital, Jinan 250002, China

**Abstract Objective** The microenvironment change after vitrectomy can induce lens opacification. Studies showed this procedure is associated with apoptosis of lens fiber cells. Present study was designed to explore the apoptosis of lens fiber cells after vitrectomy. **Methods** Thirty Dutch Belted rabbits were randomly divided into 3 groups. The right eyes of rabbits underwent partial vitrectomy. Vitreous was respectively replaced by balance salt solution (BSS), 20% C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> or silicone oil during the operation. The statue of lens opacity was evaluated under the silt lamp microscope. Two eyes were enucleated in each group at 1 day, 3, 7 days and 1 month, 3 months after surgery for the pathological examination of lens fiber cells under the light microscope. Apoptosis of lens fiber cells was detected by TUNEL and quantified by calculating the apoptotic index (AI). Two fellow eyes were as the controls. The use of animals followed the "Regulation for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals" issued by State Science and Technology Commission. **Results** The posterior subcapsular cortical opacification of lens appeared in the 3rd day in C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> group, and obvious opacification was found in 1 month in silicone group. In BSS group, focal cortical opacification was seen in 1 month after operation. The lens in C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> and silicone and BSS groups showed different degrees of opacity. In normal control group, the shape of the lens fiber nuclei under the lens epithelial cells was elongated; while in C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, silicone and BSS groups, the lens fiber nuclei at the same location presented a more spherical shape. On the 1st day after surgery, apoptosis was seen on the lens fiber cells and reached a high level on the 3rd and 7th day in C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, silicone and BSS groups. The AI in C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, silicone and BSS groups was significantly higher than that of the control group in 3 months ( $P < 0.05$ ). The AI of silicone oil group was higher than that of BSS group in the 3rd day and both BSS group and C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> group in 3 months ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Vitrectomy induce apoptosis of lens fiber cells, which may be one of the etiological factors for complicated cataract.

**Key words** vitrectomy; lens fiber cell; apoptosis

**摘要 目的** 探讨玻璃体切割术后兔晶状体纤维细胞的凋亡及意义。**方法** 将 30 只 Dutch Belted 兔按随机数字表法分为 3 组, 每组 10 只。右眼行部分玻璃体切割术, 玻璃体腔分别置换平衡盐溶液 (BSS)、20% C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>、硅油。术后 1、3、7 d、1 个月、3 个月观察晶状体混浊情况, 组织病理学观察晶状体纤维细胞形态; 原位末端核苷标记 (TUNEL) 法检测凋亡, 并计算凋亡指数 (AI)。对照组为健康兔眼晶状体。**结果** 实验各组术后晶状体不同程度混浊; 晶状体上皮细胞 (LECs) 下的纤维细胞核较对照组增大、变圆。实验组术后 1 d 晶状体纤维细胞凋亡增加, 3 d、7 d 达高峰, 1 个月后凋亡减少。3 个月内实验各组 AI 较对照组明显增高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 玻璃体切割术可诱导晶状体纤维细胞凋亡增加, 凋亡的增加可能是玻璃体切割术后并发性白内障的致病原因之一。

**关键词** 玻璃体切割; 晶状体纤维细胞; 凋亡

**分类号** R 776 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)07-0563-04

玻璃体切割术后有 58% ~ 98% 的患者出现白内障<sup>[1-2]</sup>, 其中约 50% 为核性白内障<sup>[3]</sup> 并需再次手术。

玻璃体切割术后微环境的改变导致晶状体纤维细胞的异常分化被认为是术后晶状体改变的主要因素<sup>[4]</sup>。正常晶状体纤维细胞核和细胞器的程序性降解保障了晶状体的光学透明性, 其过程类似于经典的细胞凋亡<sup>[5]</sup>。因此研究玻璃体切割术后晶状体纤维细胞的凋亡对探讨玻璃体切割术后并发性白内障的发病机制

本课题为国家自然科学基金资助 (30740029)

作者单位: 250002 济南, 山东中医药大学眼科中心 山东施尔明眼科医院

通讯作者: 毕宏生 (Email: b66hong66@yahoo.com.cn)

具有重要的意义。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验动物及主要试剂

健康 Dutch Belted 兔 30 只(山东中医药大学实验动物中心提供),雌雄不限,2.5 月龄,体重 1.5 ~ 2.0 kg,无眼部疾患。动物的使用和管理遵循国家科学技术委员会颁发的《实验动物管理条例》。平衡盐溶液(balance salt solution, BSS, 美国爱尔康公司);C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>(天津晶明公司);硅油(美国博士伦公司);细胞凋亡原位检测试剂盒(美国罗氏公司)。

#### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物模型的制作及分组** 参照 Kuszak 等<sup>[6]</sup>的方法建立玻璃体切割动物模型。氯胺酮(45 mg/kg)和甲苯噻嗪(6 mg/kg)混合肌内注射麻醉。选择右眼为实验眼,复方托吡卡胺滴眼液散瞳,盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉后放置开睑器。剪开球结膜,在上直肌的左右两侧角膜缘后 3 mm 用 20 GD 的巩膜穿刺刀做 2 个穿刺口,分别做为导光纤维和玻璃体切割头进入玻璃体腔的通道。眼内灌注管用缝线固定于 6:00 位角膜缘后 3 mm 处。将放置接触镜的金属环缝合固定于 3:00 和 9:00 位角膜缘。将广角接触镜放在金属环内, DORC 玻璃体切割仪行部分玻璃体切割(切割频率:2 500 cuts/min;吸力:11.97 kPa), BSS 持续灌注,保持眼压在 35 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)。为防止机械性晶状体损伤的发生,除睫状体部位余玻璃体尽量切除。根据随机数字表法将实验动物分为 3 组,分别在玻璃体腔填充 BSS、20% C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 和硅油。术毕将眼压调整至 22 mmHg,关闭巩膜和结膜切口。手术由同一位手术经验丰富的医师施行,手术时间控制在 30 min 以内。

**1.2.2 术后观察和取材** 术后 7 d 每日行裂隙灯显微镜和间接检眼镜检查,以后每周检查 1 次。视网膜脱离和器械接触引起的机械性白内障排除在实验组之外。术后 1、3、7 d,1 个月、3 个月每组随机抽取 2 只兔,取出晶状体于 4% 的中性甲醛中固定备用。同期取 2 只正常兔眼的晶状体作为对照。

**1.2.3 组织病理学检测** 4% 的中性甲醛固定后石蜡包埋切片,常规苏木精 - 伊红染色,光学显微镜下观察晶状体纤维细胞的形态。

**1.2.4 原位末端核苷标记(TUNEL)法检测细胞凋亡** 4% 的中性甲醛固定 48 h 后石蜡包埋切片。采用细胞凋亡原位检测试剂盒检测细胞凋亡,具体步骤按照说明书进行。DAB 显色,苏木素复染,常规脱水,透

明,中性树胶封固。结果判定:在光学显微镜下观察,细胞核呈棕色颗粒者为阳性细胞,结合形态特征,可确定凋亡细胞。每张片子取 4 个高倍视野进行凋亡细胞计数,取其平均值。以凋亡指数(apoptosis index, AI)评估细胞凋亡程度。AI = 阳性细胞数/细胞总数 × 100%。

#### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学分析。晶状体纤维细胞 AI 的测试数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组数据资料经 Levene 检验提示方差齐( $P > 0.05$ )。4 个组中晶状体纤维细胞 AI 的总体比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 晶状体混浊情况

BSS 组术后 1 个月时可观察到晶状体后缝周围皮质局限性混浊。C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 组术后 3 d 后囊下皮质出现不同程度的局限性混浊,呈水泡状或羽毛状,随着气体的吸收,混浊逐渐减轻。硅油组术后 1 个月出现后囊下皮质明显混浊,随时间延长逐渐加重(图 1)。

#### 2.2 晶状体纤维细胞的形态学观察

组织病理学显示对照组晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)下的纤维细胞核形态细长,随着向晶状体核方向的迁移,细胞核体积逐渐增大变圆。而实验各组临近 LECs 下的纤维细胞核增大、变圆(图 2)。

#### 2.3 晶状体纤维细胞凋亡的检测

实验组术后 1 d 晶状体纤维细胞凋亡增加,3 d、7 d 达到高峰,1 个月后凋亡减少(图 3)。3 个月内各时间点的各实验组 AI 与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 1)。实验各组各时间点 AI 较对照组明显增高( $P < 0.05$ )。术后 1 d、7 d、1 个月,实验各组之间 AI 比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。术后 3 d 硅油组 AI 较 BSS 组高( $P = 0.006$ ),其他各实验组之间 AI 比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。术后 3 个月硅油组 AI 较 BSS 组和 C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 组均增高( $P = 0.013$ ;  $P = 0.001$ ),而 BSS 组和 C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 组比较差异无统计学意义( $P = 0.160$ )。

### 3 讨论

玻璃体视网膜手术后导致的并发性白内障发生率较高,半年内的发病率为 17%<sup>[7]</sup>。在老年患者中,有 60% ~ 98% 的患者在 2 年内出现白内障<sup>[1]</sup>,并需再次

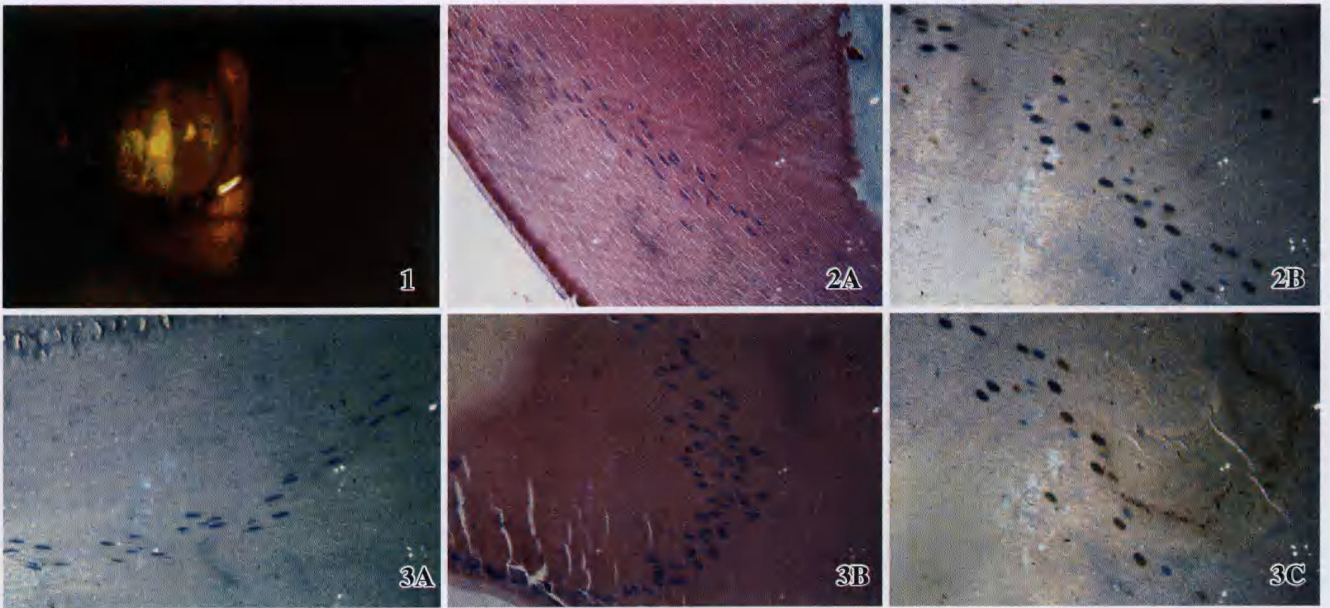


图 1 硅油充填术后 1 个月 晶状体后囊下皮质明显混浊 图 2 兔晶状体纤维细胞形态变化 (HE × 200) A: 正常兔晶状体纤维细胞核呈细长状 B: C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 组术后 7 d 晶状体纤维细胞核呈球形改变 图 3 兔晶状体纤维细胞的凋亡 (TUNEL × 200) A: 正常兔晶状体纤维细胞未见明显凋亡 B: C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> 组术后 7 d 晶状体纤维细胞凋亡细胞增多 C: 硅油组术后 7 d 晶状体纤维细胞凋亡细胞明显增多

Fig. 1 Posterior subcapsular cortical opacification of lens in silicon oil group Fig. 2 Morphologic change of rabbit lens fiber cells after surgery (HE × 200) A: Normal rabbit lens fiber showed a elongated nuclei B: Rabbit lens fiber showed spherical nuclei in C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> group on the 7th day after vitrectomy Fig. 3 Apoptosis of rabbit lens fiber cells (TUNEL × 200) A: No apoptosis cell was seen in normal rabbit lens fiber cells B: Apoptosis cells were seen in lens fiber cells in C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> group on the 7th day after vitrectomy C: Apoptosis cells were seen in lens fiber cells in silicon oil group on the 7th day after vitrectomy

表 1 实验组与对照术后不同时间点晶状体纤维细胞 AI 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of AI in lens fiber cells between experimental group and control group ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	AI in different time after operation				
	1 d	3 d	7 d	1 month	3 months
Control	15.85 ± 2.62	16.18 ± 2.54	14.06 ± 4.05	14.16 ± 3.06	16.58 ± 1.94
BSS	25.83 ± 4.54 <sup>b</sup>	31.26 ± 2.76 <sup>b,c</sup>	32.78 ± 2.07 <sup>b</sup>	21.13 ± 3.12 <sup>b</sup>	20.35 ± 3.85 <sup>b,c</sup>
C <sub>3</sub> F <sub>8</sub>	28.45 ± 2.78 <sup>b</sup>	34.25 ± 4.02 <sup>b</sup>	35.60 ± 4.61 <sup>b</sup>	25.45 ± 2.70 <sup>b</sup>	19.35 ± 2.08 <sup>b,c</sup>
Silicon oil	26.62 ± 3.70 <sup>b</sup>	36.25 ± 4.21 <sup>b</sup>	32.52 ± 4.04 <sup>b</sup>	23.56 ± 4.13 <sup>b</sup>	25.32 ± 3.03 <sup>b</sup>
F	30.64	36.43	45.56	16.67	15.43
P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

<sup>b</sup>P < 0.05 vs respective control group, <sup>c</sup>P < 0.05 vs respective silicone oil group (One-way ANOVA, LSD-t test)

手术治疗。对原发性黄斑裂孔行标准化玻璃体切割术治疗的一项多中心研究表明,核性白内障是经睫状体扁平部玻璃体切割最常见的并发症,2 年的发生率为 100%。而后囊下白内障的发生率仅为 11%<sup>[8]</sup>。因此研究玻璃体切割术后白内障,尤其是核性白内障发生的机制,对寻求积极有效的预防方法具有重要的意义。

正常 LECs 终生经历协调的细胞增生和纤维分化过程,晶状体纤维细胞核和细胞器(高尔基体、线粒体、内质网等)的程序性降解保障了晶状体的光学透

明性,其过程类似于经典的细胞凋亡,如染色质的浓缩、边聚, DNA 裂解为 TUNEL 技术可标示的高相对分子质量碎片和寡核苷酸。与经典凋亡细胞的快速消化降解不同的是,无细胞器的晶状体纤维细胞终生保留基本的细胞完整性并向晶状体中央挤压。因此晶状体纤维细胞细胞器的降解是一种受到严格调控的、以选择性进行部分凋亡为特点的过程,这一程序化过程被认为是保持晶状体透明性的关键所在<sup>[5]</sup>。

本研究观察到玻璃体切割术后晶状体纤维细胞的 AI 较正常晶状体明显增多,且越靠近晶状体中央凋亡细胞越多。异常增多的凋亡细胞可能通过 2 种途径干扰晶状体的正常代谢,一是打破了晶状体纤维细胞的增生和凋亡的平衡,使大量晶状体纤维细胞迅速分化为终末晶状体纤维,并移向晶状体核,使晶状体核提前老化。另一种可能是凋亡细胞的增多和减少的核酸内切酶(DNase II-like acid DNase, DLAD)干扰了晶状体纤维细胞核和细胞器的快速协调降解,导致异常凋亡分解产物增多,不能被及时清除,并在晶状体中央部位堆积<sup>[9]</sup>。最终加速核硬化的产生,形成核性白内障。

晶状体纤维细胞核降解最早的征象表现为核形态的改变,随着纤维细胞由周边向中央的迁移,细胞核由细长状向球形转变。本研究在实验各组的组织病理学

检测时见部分晶状体纤维细胞在周边区晶状体上皮下即有球形改变。说明玻璃体切割术后导致晶状体纤维细胞过早分化,与凋亡细胞的增多相一致。

玻璃体切割术是晶状体核硬化的高危因素,微环境改变导致晶状体纤维细胞的异常分化被认为是术后晶状体改变的主要因素<sup>[4]</sup>。玻璃体切割术破坏了视网膜的屏障作用,使许多炎性因子(如 IL-2、IFN $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )进入玻璃体腔。其中 TNF- $\alpha$  是外源性细胞凋亡信号通路的启动因子,与细胞表面的死亡受体结合后通过 Fas 相关死亡域(Fas-associated death domain, FADD)的接头蛋白使 procaspase-8 聚集,聚集的 procaspase-8 通过自身或相互之间的切割产生有活性的 caspase-8,激活的 caspase-8 又可激活下游效应分子 caspase-3<sup>[10]</sup>。活化的 caspase-3 能裂解 DNA、修复相关分子、凋亡抑制蛋白及骨架蛋白等,细胞最终裂解。Caspase 通过对细胞器的降解和对细胞骨架结构的重塑在晶状体纤维细胞分化和维持晶状体核的透明性方面发挥重要的作用<sup>[11]</sup>。微环境改变造成的过度凋亡可能是晶状体混浊的原因之一。

玻璃体视网膜术后 BSS、长效惰性气体和硅油是主要的充填物。临床研究表明,硅油充填术后白内障的发生率明显高于其他玻璃体腔充填物<sup>[12]</sup>。本实验发现硅油充填术后 3 d 凋亡指数较 BSS 组增高,3 个月时较其他 2 组明显增高。说明玻璃体腔填充物的不同可影响晶状体纤维细胞的凋亡程度,进而影响晶状体的混浊程度。

总之,玻璃体切割术后由于晶状体周围微环境的改变,导致晶状体纤维细胞凋亡增加,这一改变有可能进一步干扰晶状体纤维细胞正常细胞器的降解过程,诱导白内障的形成,为干预玻璃体切割术后晶状体混浊提供了新思路。

### 参考文献

- 1 Thompson JT, Glaser BM, Sjaarda RN, et al. Progression of nuclear sclerosis in long-term visual results after vitrectomy with transforming growth factor Beta-2 for macular holes[J]. *Am J Ophthalmol*, 1995, 119: 48 - 54
- 2 Abu El-Asrar AM, Al-Kwikbi HF, Kangave D. Prognostic factors after primary vitrectomy and perfluorocarbon liquids for bullous rhegmatogenous retinal detachment [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2009, 19: 107 - 117
- 3 Kuszak JR, Sivak JG, Moran KL, et al. Suppression of post-vitrectomy lens changes in the rabbit by novel benzopyranyl esters and amides [J]. *Exp Eye Res*, 2002, 75: 459 - 473
- 4 van Effenterre G, Ameline B, Campinchi F, et al. Is vitrectomy cataractogenic? Study of changes of the crystalline lens after surgery of retinal detachment [J]. *J Fr Ophthalmol*, 1992, 15: 449 - 454
- 5 Wride MA. Minireview: Apoptosis as seen through a lens [J]. *Apoptosis*, 2000, 5: 203 - 209
- 6 Kuszak JR, Sivak JG, Herbert KL, et al. The relationship between rabbit lens optical quality and sutural anatomy after vitrectomy [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 71: 267 - 281
- 7 Azad RV, Chanana B, Sharma YR, et al. Primary vitrectomy versus conventional retinal detachment surgery in phakic rhegmatogenous retinal detachment [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2007, 85: 540 - 545
- 8 Cheng L, Azen SP, El-Brady MH, et al. Duration of vitrectomy and postoperative cataract in the vitrectomy for macular hole study [J]. *Am J Ophthalmol*, 2001, 132: 881 - 887
- 9 Nishimoto S, Kawane K, Watanabe-Fukunaga R, et al. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens [J]. *Nature*, 2006, 424: 1071 - 1074
- 10 Liu XS, Zou H, Slaughter C, et al. A heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis [J]. *Cell*, 1997, 89(2): 175 - 184
- 11 Lee A, Morrow JS, Fowler VM. Caspase remodeling of the spectrin membrane skeleton during lens development and aging [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 20735 - 20742
- 12 魏文斌,李冬梅.玻璃体切除术后晶体的变化[J]. *国外医学·眼科学分册*, 1996, 20(5): 302 - 306

(收稿:2009-02-13 修回:2009-05-25)

(本文编辑:王莉红)

读者·作者·编者

## 本刊对中英文摘要的写作要求

论著正文前附 300 字左右的中文摘要,包括目的、方法、结果、结论四要素,关键词 3~8 个;英文摘要应比中文摘要详细,300 个实词左右。英文摘要的目的部分应概括写出本研究的研究背景和目的;方法部分应写明研究对象的数目、来源、分组情况及所用的研究方法和工具;结果部分应包括研究结果的主要形态学改变、染色的具体形态和具体测试数据。英文摘要的方法和结果部分内容的描述应用一般过去时态。英文关键词 3~8 个,应与中文关键词一致。

综述的中英文摘要不用四要素的写法,可写成指示性文摘,亦给出中英文关键词各 3~8 个;摘要用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等作主语。

(本刊编辑部)