

人玻璃体蛋白质组双向凝胶电泳技术的建立及优化

张 雯 张学东

Analysis of human vitreous humor with two-dimensional gel electrophoresis

Zhang Wen, Zhang Xuedong. Affiliated First Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract Objective The analysis of protein in the vitreous humor may elucidate the pathogenesis of various retinopathies. Proteome is an advanced method in the study on protein, and its main technique is two-dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrum (MS). This study was to optimize and establish two-dimensional electrophoresis steps for proteome analysis of the human vitreous humor. **Methods** Total soluble proteins of vitreous humor sample were extracted from 14 human donors with the age (49.3 ± 21.75). The healthy donor eyes were from eye bank of Chongqing city. Vitreous humor samples were prepared by addition of cocktail mini complete immediately and stored in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vitreous protein was collected for the mass spectrometry assay by two-dimensional electrophoresis technique. During the analysis, the experimental conditions were adjusted to find out the preferred one for vitreous humor protein analysis. **Results** The vitreous protein level was $0.14 - 0.55\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ by Bradford method. The protein loss rate of acetone, TCA/acetone and dialysis was 10.6%, 25.3%, 21.6% respectively, showing that acetone precipitation was a compatible extracted method for 2-DE of vitreous humor protein. By immobilized pH gradient gel strips (pH4 - 7, linear) running isoelectric focusing in the first dimension and casting 12% SDS equal gel in the second dimension, 2-DE maps of human vitreous humor was obtained with more than 400 spots disturbing even. The matching rate of the two maps was 82.36%, and the mean width was (1.85 ± 1.39) mm in PI and (1.97 ± 1.46) mm in MW. The repeatability of the maps was satisfied. **Conclusion** Extracting protein as acetone and using immobilized pH gradient gel strips (pH4 - 7, linear) to run isoelectric focusing in the first dimension and casting 12% SDS equal gel in the second dimension way is an effective 2-DE strategy to separate the proteins in samples. The optimized 2-DE technique of vitreous humor can be effectively applied in the study of vitreous humor proteome, which offer an useful approach to further relevant study.

Key words vitreous humor; two-dimensional electrophoresis; proteomics

摘要 目的 优化并确立一套适合人眼玻璃体的双向电泳实验方法。**方法** 收集 14 只健康捐献眼的玻璃体, 提取玻璃体总蛋白, 改进条件以确立玻璃体蛋白质的双向电泳 (2-DE) 技术流程。**结果** 以 IPG 胶条 (pH 4 ~ 7, 线性, L) 进行一向等电聚焦, 以 12% SDS 均匀胶进行二向垂直电泳, 获得人玻璃体分布均匀的双向凝胶电泳图谱并分离出 400 多个蛋白点, 凝胶图谱的重复性较好。**结论** 该优化的技术流程能有效提取及分离玻璃体蛋白质, 为进一步的差异蛋白质组研究奠定基础。

关键词 玻璃体; 双向凝胶电泳; 蛋白质组

分类号 R 776 Q812 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)07-0601-05

眼底疾病多伴随玻璃体性状和成分的异常, 研究玻璃体蛋白质在疾病过程中的变化对探索眼底疾病的发病机制、寻找防治手段有重要意义。蛋白质组和蛋白质组学^[1]是在人类基因组计划研究完成后形成的一个崭新领域, 在 21 世纪生命科学的前沿研究中占有举足轻重的地位。蛋白质组指“一个基因组、一个细

胞或一种组织所表达的全部蛋白质”, 这一概念最早在 1995 年由 Wasinger 等^[2]提出。蛋白质组学研究方法具有高灵敏度及高分辨率的优点, 其兴起为研究玻璃体蛋白质提供了新的技术支持。其核心技术性方法是双向凝胶电泳 (two-dimension gel electrophoresis, 2-DE), 电泳成功与否直接影响后续蛋白质分析方法即质谱分析 (mass spectrometry, MS) 的结果。本实验以正常捐献眼玻璃体为样品, 对 2-DE 各步骤及研究条件进行优化调整, 建立了一套适用于玻璃体组织的稳

作者单位: 400016 重庆医科大学第一附属医院眼科 (张雯, 硕士研究生, 现在西安市中心医院眼科 710003)

通讯作者: 张学东 (Email: zxued@sina.com)

定双向电泳程序,对下一步疾病玻璃体蛋白质组的研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 一向等电聚焦所用的 IPG 胶条 (immobilized pH gradient strip, IPG strip)、尿素、两性电解质载体 (美国 Bio-Rad 公司); 硫脲、二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT)、40% 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液 (质量比为 29:1, 交联度为 3.3%)、3-[3-胆酰胺丙基]-二乙胺-1-丙磺酸 (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulphonate, CHAPS)、碘乙酰胺 (iodoacetamide, IAA)、十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulphate, SDS)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris)、甘氨酸 (glycine, Gly)、过硫酸铵 (ammonium persulfate, APS)、四甲基乙二胺 (N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylenediamine, TEMED)、琼脂糖、覆盖矿物油、甘油、硝酸银 (AgNO₃) (美国 Amersco 公司); 丙酮、三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA)、硫代硫酸钠 (Na₂S₂O₃ · 5H₂O)、碳酸钠、乙酸钠 (NaAc · 3H₂O)、乙二胺四乙酸二钠 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、无水乙醇、冰醋酸、甲醛、甲醇、磷酸等均为国产分析纯。等电聚焦电泳仪 (IPGphor) 及其配套装置、二向垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳仪 (protean II electrophoretic cell) 及其配套装置 (美国 Bio-Rad 公司); 透射扫描仪 (MICROTEK 4850 II SCANNER, 上海中晶科技有限公司); 蛋白浓度测定试剂盒 (上海生物工程有限公司)。

1.1.2 主要溶液的配制 (1) 样品裂解液: 7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、2% IPG Buffer (pH 3 ~ 10/4 ~ 7, 非线性)、65 mmol/L DTT、40 mmol/L Tris; (2) 再水化液: 7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、2% IPG Buffer (pH 3 ~ 10/4 ~ 7, NL)、1% DTT; (3) 平衡液 I: 6 mol/L 尿素、Tris-HCl (pH 8.8, 0.375 mol/L)、2% SDS、30% 甘油 (V/V)、1% DTT; (4) 平衡液 II: 6 mol/L 尿素、Tris-HCl (pH 8.8, 0.375 mol/L)、2% SDS、30% 甘油 (V/V)、2.5% IAA; (5) 1 × 电泳缓冲液: Tris-HCl (pH 8.8, 25 mmol/L)、甘氨酸 (192 mmol/L)、0.1% SDS; (6) 12% 二向均匀胶 (40 mL): 30% 丙烯酰胺溶液 13.3 mL, Tris-HCl (pH 8.8, 1.5 mol/L) 10 mL, 10% SDS 0.4 mL, 10% 过硫酸铵 0.4 mL, TEMED 0.016 mL, MilliQ 水 15.9 mL。

1.1.3 标本采集 健康供体眼 14 只均取自重庆市眼

库, 供体年龄为 (49.3 ± 21.75) 岁, 其中男 10 例, 女 4 例; 捐献者死亡后 12 h 内采集玻璃体组织, 冷冻状态下在角膜后 8 mm (锯齿缘附近) 环形切开眼球, 去除睫状体、晶状体与部分与晶状体后囊相邻的前玻璃体, 暴露玻璃体腔并从中央部取出玻璃体, 每眼约 1 mL, 立即加入蛋白酶抑制剂 (cocktail mini complete^[3], 瑞士 Roche 公司), 0.5 mL/EP 管分装后 -80 °C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 双向凝胶电泳 (1) 样品制备。-80 °C 条件下取出玻璃体标本, 4 °C 解冻并保持。按样品: 裂解液比例为 1:4 将玻璃体样品在 4 °C 下裂解 2 h, 14 000 g 4 °C 离心 30 min, 取上清即为玻璃体总蛋白溶液。(2) 蛋白浓缩提纯。丙酮沉淀: 按蛋白溶液: 丙酮比例 1:4 用预冷丙酮对蛋白溶液进行沉淀, -20 °C 不少于 4 h。14 000 g 4 °C 离心 30 min, 弃上清, 预冷丙酮清洗沉淀片, -20 °C 静置 2 h, 14 000 g 4 °C 离心 30 min, 弃上清, 将沉淀在通风厨中晾干。丙酮/TCA 沉淀, 按蛋白溶液: 10% TCA/丙酮 (含 20 mmol/L DTT) 溶液比例 1:4 进行沉淀, -20 °C 不少于 4 h。14 000 g 4 °C 离心 30 min, 弃上清, 以预冷丙酮 (含 20 mmol/L DTT) 清洗沉淀, -20 °C 静置不少于 4 h, 重复 2 次, 将沉淀在通风厨中晾干。透析法: 使用 Pluse One 微透析试剂盒处理样品, 严格按照说明书步骤进行操作, 将透析过的样品进行 80% 丙酮沉淀, 在通风橱中晾干。将蛋白沉淀在上样前重悬于再水化液。(3) 蛋白质量浓度测定。严格按照蛋白质量浓度测定试剂盒说明书操作, 采用 Bradford 法测定样品液蛋白质量浓度, 并据此浓度确定一向等电聚焦电泳的上样量。(4) 等电聚焦。选用 17 cm 线性 pH 3 ~ 10/pH 4 ~ 7 IPG 预制干胶条, 以银染为标准, 按每根胶条蛋白质总上样量为 300 μg 被动水化。设置盐桥, 将充分水化的胶条进行等电聚焦, 电压梯度均为阶梯型, 条件见表 1, 一向电泳总聚焦不少于 70 000 Vhr。(5) IPG 胶条平衡: 等电聚焦结束后立即进行平衡, 常温下分别以平衡液 I 和 II 在摇床上平衡 15 min。(6) 垂直 SDS-PAGE: 将平衡后的一向胶条放置在二向凝胶的顶端, 参照 Nakanishi 等^[4]的二向电流参数进行优化恒流电泳 (10 mA 50 min; 25 mA 至电泳结束), 至指示剂至凝胶底部电泳结束。

1.2.2 染色 电泳完毕立即进行染色。参照文献 [5] 的银染法进行调整染色。

1.2.3 图像的获取及分析 以 Scanmaker4685 扫描仪扫描凝胶, 分辨率为 600 bpi。PD Qeust8.1 软件将凝胶图像进行对比分析, 归一化处理后经自动匹配、人工审核及再匹配, 提高凝胶分析准确性。

表 1 PROTEAN IEFCELL 等电聚焦系统参数设置(T = 17 °C)
Table 1 IPG dry strips IEF parameters for PROTEAN IEFCELL isoelectric focusing(T = 17 °C)

| Step | Voltage(V) | Step duration(hr) | Gradient type |
|---------------------|------------|-------------------|---------------|
| Passive rehydration | 0 | 14 | — |
| 1 | 100 | 5 | Slow |
| 2 | 250 | 3 | Slow |
| 3 | 500 | 1 | Slow |
| 4 | 1 000 | 3 | Slow |
| 5 | 10 000 | 5 | Linear |
| 6 | 10 000 | (60 000Vhr) | Rapid |
| 7 | 500 | maintain | Rapid |

2 结果

2.1 玻璃体蛋白质质量浓度范围

14 例共 14 只捐献眼的玻璃体,以 Bradford 法测定蛋白质质量浓度,计算出玻璃体蛋白质量浓度为 0.14 ~ 0.55 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.2 建立双向电泳分析玻璃体蛋白质的方法

2.2.1 玻璃体样品的处理方法 采用丙酮沉淀法、TCA/丙酮沉淀法及透析法,将未经沉淀的玻璃体蛋白质量浓度、经 3 种方法处理后的蛋白质量浓度进行对比,丙酮沉淀法的蛋白质损失率为 10.6%,TCA/丙酮沉淀法的蛋白损失率为 25.3%,透析法的蛋白损失率为 21.6%,沉淀法均能得到理想的聚焦电压,蛋白点较清晰,条纹较少(图 1,2),其中 TCA/丙酮沉淀法的低丰度蛋白区蛋白较丙酮沉淀法的相应区域的蛋白点少,而透析法处理的样品在一向 IEF 时电压升至 5 000 V(17 cm IPG 胶条)左右不再升高,即聚焦效果不好(图 3),横竖条纹均较多,大部分蛋白堆积在胶的上部,分离效果不好。因此认为对于玻璃体样本,沉淀法优于透析法,丙酮沉淀法的效果优于 TCA/丙酮沉淀法。并且 TCA/丙酮沉淀法操作步骤较多,增加了

实验过程中的样品耗损。

2.2.2 IPG 胶条 pH 范围 根据 Nakanishi 等^[4]及 Yamane 等^[6]的实验结果,本实验选择了 pH 3 ~ 10 和 pH 4 ~ 7 2 种梯度 IPG 胶条,玻璃体蛋白质大多聚集在 pH 5 ~ 7,所以选用窄 pH 梯度,即 pH 4 ~ 7,能够更好地进行水平方向的分离(图 4)。

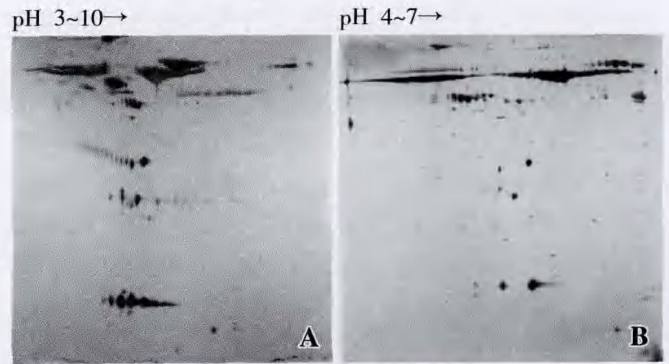


图 4 不同 pH 梯度的玻璃体蛋白 2-DE 图谱(17 cm) A: pH3 ~ 10 B: pH4 ~ 7

Fig. 4 The 2-DE protein profiles of vitreous humor(17 cm) A: pH3 ~ 10 B: pH4 ~ 7

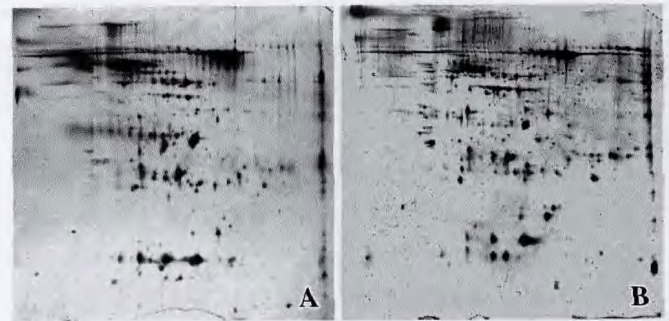


图 5 2-DE 图谱的重复性 A: 对照组 B: PVR 组

Fig. 5 The reproducibility of 2-DE protein profiles A: 2-DE protein profile of control group B: 2-DE protein profile of PVR group

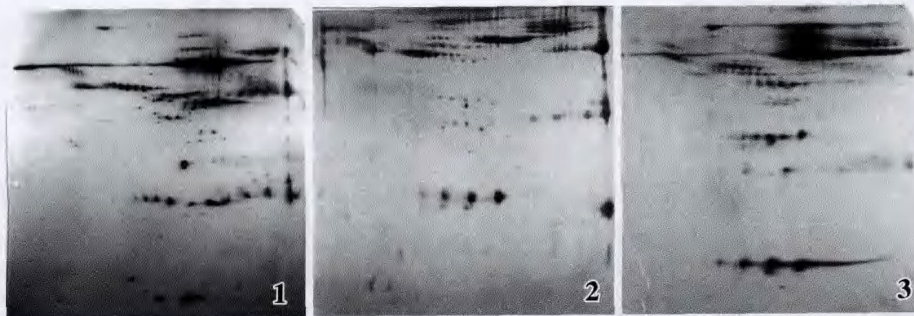


图 1 经丙酮处理的玻璃体蛋白 2-DE 图谱 图 2 经 10% TCA/丙酮处理的玻璃体蛋白 2-DE 图谱 图 3 经透析法处理的玻璃体蛋白 2-DE 图谱

Fig. 1 The 2-DE protein profile of vitreous humor extracted by acetone Fig. 2 The 2-DE protein profile of vitreous humor extracted by 10% TCA/acetone Fig. 3 The 2-DE protein profile of vitreous humor extracted by dialysis

2.2.3 双向凝胶图像的重复性

一向等电聚焦选用 17 cm pH 4 ~ 7 IPG 胶条,相同实验条件及电泳参数下,标本重复电泳 4 次,获得理想稳定的二维凝胶图像如图 5。随机选择 2 幅不同时间获得的凝胶图像来评价实验的重复性。PD Quest 8.1 软件对凝胶图像的分析结果显示,2 幅图像分别可检测到蛋白点 432 ± 32.5 。2 幅图谱的匹配率为 82.36%,在 pI 方向上的平均偏差为 (1.85 ± 1.39) mm,在

MW 方向上的平均偏差为(1.97 ± 1.46) mm。

3 讨论

要深入了解生命活动的本质,仅以基因组及细胞组织形态学的改变解释是不够的,衔接上述二者的生物大分子及蛋白质是生命活动的执行者,了解蛋白质在生物的生长、发育及衰老等整个生命过程中的功能、不同蛋白质之间的相互作用及其与疾病的关系具有重要意义^[7-8]。

2-DE 是目前首要的蛋白质分离技术,但因其步骤繁多、实验条件严格复杂,电泳结果的稳定性和重复性仍是 2-DE 技术的主要问题,目前尚无一套适用于所有组织、细胞及体液成分的电泳方法。人类玻璃体样品难于获得且样品量不足,加之玻璃体组织常由于疾病破坏血-视网膜屏障、玻璃体腔内出现不同程度的细胞增生或增生条索、外伤炎症等致使其成分差异较大,因此实验条件难以控制。目前国际上对玻璃体组织进行蛋白组学分析的报道非常有限,且所采用的样品处理方法和电泳条件也存在差异性,而国内尚无此方面研究,建立一套稳定的玻璃体 2-DE 技术是分析眼底疾病中病变玻璃体蛋白质组的关键。本研究对正常人眼玻璃体进行双向电泳,探讨玻璃体样品制备方法和双向电泳的各种实验条件,为后续疾病玻璃体的蛋白组分析奠定基础。

3.1 人玻璃体样品的取材及处理

3.1.1 样品的一致性 样品的一致性实验结果可靠性的保证,本实验参照 Neal 等^[9]的标本采集方法,在冷冻状态直接去除眼前段组织,而不选用粗针抽吸法^[10],减少了因巩膜穿刺将眼壁残留血液及色素细胞带入玻璃体的可能性,保持了玻璃体样品的纯度。样品取出后立即加入蛋白酶抑制剂,并始终注意低温操作以减少蛋白质的降解。进行一向电泳前将多例样品混匀,消除个体间差异,保证样品的一致性。

3.1.2 样品的处理 正确地处理样品是双向电泳的关键步骤,其好坏直接影响电泳凝胶图像的形态及后续的肽指纹图谱检测。人类玻璃体中 90% 的成分为水,类似于脑脊液等体液,其盐分较高而蛋白质质量浓度较低,样品高盐分会导致一向等电聚焦电压不升高或聚焦失败,必需经过除盐及蛋白质浓缩后才能进行电泳,使用有机溶剂对样品中的蛋白质进行沉淀,可以在去处脂类、盐分等杂质的同时达到蛋白质浓缩的目的,使样品得到纯化,并且其操作相对简单,故在双向电泳技术中经常使用^[11]。

本实验分别进行了 3 种样品处理方法,沉淀法处

理的样品液在一向等电聚焦时均获得了理想的聚焦电压,说明沉淀法可以达到较理想的除盐效果,且处理过程比透析法简单、经济。经过对 2 种沉淀方法处理前后样品蛋白损失的比较可以看出,TCA/丙酮沉淀的蛋白丢失率明显高于单纯丙酮沉淀。Yuan 等^[12]对比了丙酮沉淀和 TCA/丙酮沉淀对脑脊液样品的影响,发现 TCA/丙酮沉淀除盐较多但蛋白质回收率明显降低,与本实验结果类似。TCA/丙酮沉淀在除去白蛋白的同时也丢失了部分低分子蛋白,而低分子蛋白质往往是一些功能性蛋白质,在疾病的发生发展中可能起重要作用。而 Dunn 等^[13]认为丙酮沉淀后没有蛋白点的丢失,仅可能有量的丢失。本实验经丙酮沉淀浓缩后的样品蛋白质量浓度为 4.5 ~ 12.5 mg/L,满足银染的上样浓度,并且凝胶图像各分子量蛋白点质量浓度较均一,具有较好的重复性和分辨率,而 TCA/丙酮沉淀后同一浓缩倍数的蛋白质量浓度相比丙酮沉淀法明显降低,凝胶图像可见有效地降低了大分子区高丰度蛋白质的量,但也造成了较多中小分子区蛋白点的明显丢失。本研究认为,人类玻璃体样品量非常有限,丙酮沉淀法具有操作简便、蛋白损失小等优点,比 TCA/丙酮沉淀法更适合人类玻璃体样品的处理。

3.2 双向电泳条件的优化

3.2.1 一向等电聚焦电压设置的优化 由于本实验对样品进行了沉淀浓缩,而沉淀法并不能完全去除样品中的盐分,难以避免样品中的盐分会随浓缩过程而增加,故在一向等电聚焦升压过程中,充分延长低压除盐的时间达到进一步除盐的目的,可使整个一向等电聚焦过程处于一个低电流下,保证样品蛋白在 pH 方向(水平方向)的良好分离。

3.2.2 SDS-PAGE 电泳条件的优化 SDS-PAGE 凝胶电泳是一种方法成熟、结果稳定的电泳方法,但在用于双向电泳的二向电泳时和单纯的 SDS-PAGE 凝胶电泳有几处不同,而且其步骤较多,在双向电泳过程中属于技术部分,需要熟练的操作保证凝胶图像的可重复性。(1)制胶时应保证凝胶上面平整,避免蛋白质从一向胶条向二向凝胶转移时的丢失。灌胶后本研究选用 MilliQ 水和无水乙醇 2 种封面液,无水乙醇封面时能够观察到清晰的胶-液面以确定胶面是否平整并有利于及时调整胶面,但由于无水乙醇较轻且挥发较快,容易出现胶面过度挥发、局部凝胶收缩、胶面起伏及浓度改变等问题,本研究采用 MilliQ 水封面,MilliQ 水比无水乙醇密度高,能更有效地压平胶面且挥发慢,得到了理想的凝胶平面。(2)电泳环节中的气泡会增加电泳的电阻并使凝胶图像畸变,在制胶、放入一向 IPG 胶条

及将二向凝胶放入电泳槽时均应严格避免产生气泡。

(3) 不同种类样品的电流设置不同, 电流过大电泳过快会增加图像纵向拖尾、降低分辨率, 本研究认为, 玻璃体样品的二向电泳时间在 5 ~ 7 h 比较理想。

3.3 染色方法的选择

为了提高低丰度蛋白的检出率, 我们选择了检测蛋白质的灵敏度可达 1 ~ 5 ng 的银染色方法, 获得背景清晰、着色均匀的凝胶图像。同时对比了 2 种非双胺化学显色硝酸银染色方法, 经过对凝胶图像的对比分析, 在凝胶分辨率、背景透明度、蛋白点数量及浓度上 2 种染色方法均无明显差别。

本实验通过一系列的优化措施, 对人玻璃体样品的取材方法、蛋白的提取、双向电泳条件进行比较优化, 获得了稳定的人眼玻璃体蛋白质双向凝胶图谱。双向电泳获得的图谱不仅是使蛋白分开, 还能通过对正常和病理状态下蛋白图谱的比较筛选出具有临床意义的关键蛋白质, 以及发现在信号传递中起重要作用的蛋白质分子, 并可能找到药物作用的靶蛋白质分子, 为今后对眼底病的病因学及新药研究奠定基础。

参考文献

1 Fields S. Proteomics: Proteomics in genomeland [J]. Science, 2001, 291: 1221 - 1224

- 2 Wasinger VC, Cordwell SJ, Anne CD, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes; Mycoplasma genitalium [J]. Electrophoresis, 1995, 16: 1090 - 1094
- 3 Ouchi M, West K, Crabb JW, et al. Proteomic analysis of vitreous from diabetic macular edema [J]. Exp Eye Res, 2005, 81: 176 - 182
- 4 Nakanishi T, Koyama R, Ikeda R, et al. Catalogue of soluble proteins in the human vitreous humor; comparison between diabetic retinopathy and macular hole [J]. J Chromatography B, 2002, 776: 89 - 100
- 5 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2005: 107
- 6 Yamane K, Minamoto A, Yamashita H, et al. Proteome analysis of human vitreous proteins [J]. Mol Cell Proteom, 2003, 2: 1177 - 1187
- 7 Melle C, Ernst G, Escher N, et al. Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker [J]. Clin Chem, 2007, 53(4): 629 - 635
- 8 Pereira L, Reddy AP, Jacob T, et al. Identification of novel protein biomarkers of preterm birth in human cervical-vaginal fluid [J]. J Proteome Res, 2007, 6(4): 1269 - 1276
- 9 Neal RE, Bettelheim FA, Lin C, et al. Alterations in human vitreous humor following cataract extraction [J]. Exp Eye Res, 2005, 80: 337 - 347
- 10 陈晶华, 黎晓新. 人眼玻璃体黏度的研究 [J]. 眼科研究, 2001, 19(5): 405 - 406
- 11 Flengsrud R, Kobro G. A method for two-dimensional electrophoresis of proteins from green plant tissues [J]. Anal Biochem, 1989, 177(1): 33 - 36
- 12 Yuan XY, Russell T, Wood G, et al. Analysis of the human lumbar cerebrospinal fluid proteome [J]. Electrophoresis, 2002, 23(7 - 8): 1185 - 1196
- 13 Dunn MJ, Burghes AHM. Gel electrophoresis of proteins [M]. Oxford: Bios Scientific Pub Ltd, 1993: 203

(收稿: 2008-09-04 修回: 2009-03-22)

(本文编辑: 刘 艳)

· 临床经验 ·

LASIK 术后早期配戴角膜接触镜预防角膜瓣相关并发症的观察

刘 军 苏亚丽 王新华 王淑丽 刘晓芳 崔红领

准分子激光原位角膜磨镶术 (laser in situ keratomileuses, LASIK) 是目前矫正屈光不正的常用方法, 该方法保存了前弹力层和角膜上皮, 更符合角膜的解剖结构和生理功能, 但可发生角膜瓣相关并发症, 如角膜瓣移位、皱褶、层间混浊、角膜上皮植入等。我们观察 LASIK 术后早期配戴角膜接触镜对角膜瓣相关并发症的影响, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2005 年 1 月—2007 年 10 月在我院接受双眼 LASIK 并连续随访 1 年的 128 例患者的临床资料, 其中男 75 例, 女 53 例; 年龄 18 ~ 45 岁, 平均 (25.54 ± 7.68) 岁。术前屈光度为 -2.00 ~ -12.00 D, 平均等效球镜 (-5.50 ± 1.35) D, 散光屈光度为 0 ~ -3.00 D。术前均排除眼局部及全身手术禁忌证。

1.2 器械设备 采用美国博士伦公司的 Technolas 217 型准分子激光和 Hanstome 角膜板层刀。软性角膜接触镜为美国强生

公司生产的日戴型, 基弧 8.5 mm, 直径 14.2 mm, 屈光度 -0.50 D, 含水量 58%。

1.3 手术方法 手术由同一医师完成。0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液表面麻醉, 放置负压吸引环, 安装角膜板层刀, 切开角膜瓣厚 120 ~ 160 μm, 蒂位于上方。在瓣下按预期矫正度数行激光切削角膜基质, 冲洗基质床及角膜瓣, 仔细复位。术毕左眼戴用软性角膜接触镜, 右眼不戴角膜接触镜作为对照。术后 1 d 取镜, 常规应用妥布霉素地塞米松滴眼液 (妥布霉素 15 mg + 地塞米松 5 mg/5 mL) 点眼, 每日 4 次, 连续应用 1 周。

1.4 术后观察及随访 术后 1 d、3 d、1 周、2 周、1 个月复诊 1 次, 以后每个月复诊 1 次, 随访 1 年。随访期间行视力、裂隙灯、屈光度、眼压检查。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计学软件进行统计学分析。角膜接触镜佩戴组与非佩戴组间并发症发生率比较采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

随访期间裂隙灯下发现右眼发生瓣移位皱褶 18 眼, 左眼 4

作者单位: 462000 漯河市中心医院眼科

通讯作者: 刘军 (Email: chllgex@sina.com)