

玻璃体切割术后晶状体酶活性的变化

刘晓萃 王 萍 严 宏

Changes of enzyme activities in lens after vitrectomy

Liu Xiaocui, Wang Ping, Yan Hong. Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

Abstract Objective Vitrectomy is a common treating approach to multiple kinds of vitreoretinopathy and ocular trauma. However, metabolism of lens protein often alter following vitrectomy. Research showed the incidence of lens opacity was 68% - 98% after vitrectomy. Present study was to investigate the enzyme activity in lens after vitrectomy and study the mechanism of post-vitrectomy cataract. **Methods** Sixteen eyes of eight New-Zealand rabbits (2.3 - 2.4 kg) were divided into two groups. The left eyes of rabbits underwent standard three port pars plana vitrectomy to remove all visible vitreous gel, and the normal right eyes served as controls. Transparency of lens was monitored by a slit lamp biomicroscopy before and after vitrectomy. The morphology of lens cells was observed under the light microscope. The activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, glutathione reductase (GR), catalase in lenses were detected five months after vitrectomy. The experimental procedure of animals followed the Standard of Association for Research in Vision and Ophthalmology. **Results** Lenses were clear in both operation group and normal control group from one month through five months after operation. The morphology and structure of lens cells were normal under the light microscope in both operation group and normal group at the fifth month after operation. The activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ was significantly decreased in operation group compared with control group (0.0249 ± 0.0047 versus 0.0572 ± 0.0089 , $t = 7.872$, $P = 0.004$), and so was the catalase (2.0395 ± 0.156 versus 2.4744 ± 0.1002 , $t = 5.745$, $P = 0.000$) and GR (2.6508 ± 0.0898 versus 2.7891 ± 0.0817 , $t = 2.791$, $P = 0.019$) between operation group and control group. The activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, catalase and GR declined by 56%, 17% and 5% respectively in comparison with control group. **Conclusion** Vitrectomy can induce the change of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, catalase and GR in lens in rabbit.

Key words vitrectomy; lens; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; catalase; glutathione reductase

摘要 目的 观察玻璃体切割术后晶状体酶活性的变化,探讨玻璃体切割术后白内障的发病机制。**方法** 新西兰白兔 8 只(16 只眼)分为 2 组,左眼为玻璃体切割组,行经睫状体扁平部次全玻璃体切割术,右眼为正常对照组。定期观察晶状体混浊情况,5 个月后取出晶状体行 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽还原酶活性检测。**结果** 5 个月后,玻璃体切割组晶状体在透明度和组织形态学上与正常对照组差异无统计学意义,玻璃体切割组与正常对照组相比, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽还原酶活性分别下降了 56%、17% 和 5%,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 玻璃体切割术可使成年兔晶状体发生生物化学改变,对研究玻璃体切割术后白内障的发生发展机制有重要的指导意义。

关键词 玻璃体切割术; 晶状体; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶; 过氧化氢酶; 谷胱甘肽还原酶

分类号 R 772.01 文献标识码 A 文章编号 1003-0808(2009)08-0645-04

玻璃体切割术已广泛地应用于临床,尤其在各种玻璃体视网膜疾病和眼外伤的救治过程中,但玻璃体切割术后出现晶状体混浊,影响患者视功能的恢复,目前越来越引起人们的关注,国外报道经过 2 年的随访,发生率为 68% ~ 98%,特别是老年患者,但其确切的

发病机制至今尚不清楚^[1]。本研究通过对维持晶状体透明性有重要作用的酶活性的观察,进一步从不同层面证实玻璃体切割术后白内障形成的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

6 月龄健康普通级新西兰白兔 8 只(第四军医大学实验动物中心提供),雌雄不限,体重 2.3 ~ 2.4 kg;

本课题为国家自然科学基金资助(30872837)

作者单位:710038 西安,中国人民解放军第四军医大学唐都医院眼科

通讯作者:严宏 (Email: yhongb@fmmu.edu.cn)

全身及眼部检查均正常。考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、超微量 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶测试盒、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 测定试剂盒 (可见光法)、谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。手术显微镜 (德国 Moller-Wedel 公司); 玻璃体切割机为 Megatron (德国); 紫外可见分光光度计 (DU640, 美国 Backman 公司)。实验动物的应用遵循 ARVO 声明。

1.2 方法

1.2.1 兔眼玻璃体切割术

术前 1 d 给予预防性 0.3% 氧氟沙星滴眼液点双眼, 每日 4 次, 术前禁食、禁水 8 h。将每只兔双眼用 1% 复方托吡卡胺滴眼液充分散大瞳孔, BQ900 裂隙灯观察并记录、照相。5 mg/kg 噶拉嗪、45 mg/kg 氯胺酮混合肌内注射麻醉后将兔子固定于手术台上, 眼周碘伏消毒, 新鲜配制的 0.05% 碘伏消毒液冲洗左眼结膜囊。切开左眼球结膜, 在角膜缘后 5 mm 处行巩膜穿刺口, 分别置入切割头、光纤和灌注头, 角膜上放置平凹型接触镜, 在手术显微镜下行经睫状体扁平部次全玻璃体切割术, 确保切除兔眼玻璃体腔中轴、晶状体后及视网膜前的玻璃体凝胶。灌注液为眼用平衡盐液 (250 mL BSS + 1 万单位硫酸庆大霉素注射液 + 2.5 mg 地塞米松磷酸钠注射液 + 0.8 mg 盐酸肾上腺素注射液), 输液瓶置于高出手术台 35 cm 处, 取出切割头时灌注液从穿刺口自由溢出, 缝合巩膜穿刺口。术中平均玻璃体切割和平衡盐液灌注时间为 10 min。手术严格无菌操作, 术中注意避免手术器械碰伤晶状体和视网膜, 由于手术操作失误导致 1 只眼机械性损伤晶状体, 剔除实验。术毕结膜下注射硫酸庆大霉素注射液 1 万单位。

1.2.2 裂隙灯观察术后兔晶状体

术后复方硫酸新霉素滴眼液 (山东博士伦福瑞达制药有限公司) 点双眼, 每日 4 次, 红霉素眼膏涂眼, 每日 1 次, 持续 7 d。术后定期用 1% 复方托吡卡胺滴眼液点双眼散大瞳孔, BQ900 裂隙灯观察兔晶状体, 裂隙宽度 0.2 mm, 光带射入角度为 35° , 放大倍数为 6 倍, 使用 BQ900 裂隙灯自带数码相机照相。每周根据晶状体混浊情况分级, 分级标准参考英国牛津大学眼科实验室晶状体分级方法分为 0 级: 透明; 1 级: I 级核并且晶状体出现轻微缝痕; 2 级: II 级核; 3 级: III 级核; 4 级: III 级核并且晶状体出现裂痕; 5 级: IV 级核并且晶状体出现裂痕; 6 级: IV 级核并且晶状体出现放射状混浊; 7 级: 晶状体完全混浊, 已经无法看见放射状混浊。

1.2.3 测定 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、CAT、GR 的活性

玻璃体切割术后 5 个月, 耳缘静脉空气栓塞处死 7 只兔, 取

其眼球, 剔除肌肉、筋膜等组织, 由后极部视神经孔处剪开巩膜, 取出晶状体, 每组将 1 枚晶状体放入甲醛固定液中固定 24 h, 横断面切开, 石蜡包埋, 常规苏木精 - 伊红染色, 树胶封片, 光学显微镜下观察细胞形态、大小及细胞核染色情况并照相。每组取 6 枚晶状体, 以 1:9 生理盐水在 0°C 冰水中研磨 10 min, 制成 10% 组织匀浆。3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液行水溶性蛋白质含量, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、CAT、GR 活性测定, 实验中严格按试剂盒说明的实验步骤进行操作。

1.3 统计学方法

所有数据均经 SPSS 13.0 统计学软件进行处理。晶状体中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、CAT、GR 活性的测定数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对照组与手术组间各检测指标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 晶状体形态学观察

术后 1 个月内每周采用裂隙灯依次观察兔晶状体皮质、核及后囊, 手术眼和对照眼晶状体密度均匀一致, 均保持透明, 1 个月后改为每月观察晶状体混浊变化。术后 1~5 个月手术眼晶状体与对照眼晶状体均保持透明。5 个月后苏木精 - 伊红染色见手术眼及对照眼晶状体纤维细胞均排列整齐紧密, 层次分明, 大小均匀一致, 核蓝染, 胞浆红染。

2.2 晶状体相关酶活性检测

兔眼玻璃体切割术后 5 个月, 玻璃体切割组晶状体的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性为 0.0249 ± 0.0047 , 正常对照组为 0.0572 ± 0.0089 , 活性下降 56% ($t = 7.872$, $P = 0.004$) (图 1); 玻璃体切割组晶状体的 CAT 活性为 2.0395 ± 0.156 , 正常对照组为 2.4744 ± 0.1002 , 活性下降 17% ($t = 5.745$, $P = 0.0002$) (图 2); 玻璃体切割组晶状体的 GR 活性为 2.6508 ± 0.0898 , 正常组为 2.7891 ± 0.0817 , 活性下降 5% ($t = 2.791$, $P = 0.019$) (图 3)。

3 讨论

研究结果表明, 玻璃体切割术后白内障发生率高的主要机制: 玻璃体微环境的变化; 玻璃体腔内氧分压梯度改变, 增加了晶状体氧暴露的时间; 填充物 (气体和硅油) 的直接影响; 玻璃体切割术后葡萄膜炎; 手术时间; 患者年龄及眼部疾患等因素^[1]。目前, 玻璃体切割术后玻璃体腔内氧分压梯度改变, 增加了晶状体氧暴露时间导致晶状体混浊的氧化损伤学说是白内

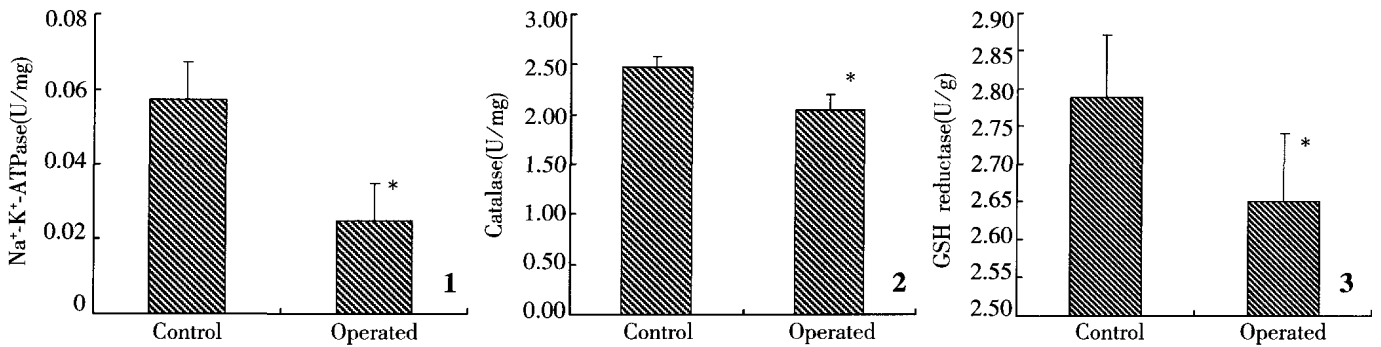


图1 玻璃体切割对兔晶状体 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响 ($t=7.872, P=0.004$) 图2 玻璃体切割对兔晶状体过氧化氢酶活性的影响 ($t=5.745, P=0.000$) 图3 玻璃体切割对兔晶状体 GR 还原酶活性的影响 ($t=2.791, P=0.019$)

Fig. 1 The effect of vitrectomy on the activity of Na⁺-K⁺-ATPase in rabbit lenses ($t=7.872, P=0.004, n=6$) Fig. 2 The effect of vitrectomy on the activity of CAT in rabbit lenses ($t=5.745, P=0.000$) Fig. 3 The effect of vitrectomy on the activity of GR in rabbit lenses ($t=2.791, P=0.019$) (Student's *t* test)

障形成的重要理论依据。

大量研究表明,人和动物的晶状体周围氧水平较低^[2],正常人晶状体蛋白质处于相对低氧状态,这是保持晶状体透明的重要因素^[3]。Holekamp 等^[4] 报道 69 例患者于玻璃体切割手术期间行氧张力的测定。玻璃体切割术前玻璃体氧张力较低,靠近晶状体处为 (8.7 ± 0.6) mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa),玻璃体中央处为 (7.1 ± 0.5) mmHg。玻璃体切割术后即刻,液体填充眼氧张力较高,靠近晶状体处为 (69.4 ± 4.8) mmHg,玻璃体中央处为 (75.6 ± 4.1) mmHg,玻璃体切割术前和术后氧张力的差异有统计学意义,表明玻璃体切割手术期间和术后较长时间眼内氧张力显著增高。持续的氧化损伤会引起晶状体透明度的下降和白内障的形成^[5]。

本研究中,尽管术后 5 个月晶状体透明度无明显变化,但与晶状体代谢相关的生物化学指标有变化。本研究观察到玻璃体切割术后晶状体发生了生物化学改变,手术眼与对照眼相比,构成晶状体防御体系的 Na⁺-K⁺-ATP 酶、CAT 和 GR 活性均有所下降,说明玻璃体切割术会不同程度地影响晶状体的代谢。离子平衡对维持晶状体透明性具有至关重要的作用,而 Na⁺-K⁺-ATP 酶是调节细胞内外离子平衡的关键酶^[6], Na⁺-K⁺-ATP 酶活性降低会破坏离子平衡,导致膜功能损伤,使晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) Na⁺ 和水积聚,引起晶状体肿胀。随年龄增加,晶状体囊膜对阳离子的渗透性增加,因此 Na⁺-K⁺-ATP 酶对老化的晶状体更重要^[7]。流行病学资料显示中老年人更易发生玻璃体切割术后白内障^[8]。氧化损伤也可以损伤细胞膜的通透性,引起 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性降低^[9]。本研究结果显示玻璃体切割术后 5 个月,兔晶状体 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性较对照组下降了 56%

($P < 0.05$),也支持了这一观点。过氧化氢酶在正常晶状体抗氧化防御系统中起重要作用^[10]。CAT 是一类以铁卟啉为辅基的结合酶,位于线粒体,有极强的还原作用,具有较强的自由基清除功能,能及时有效地清除 H₂O₂ 的有害影响,对组织的氧化损伤有防护作用。在实验中,玻璃体切割术后 5 个月的晶状体与对照组相比,CAT 活性下降了 17% ($P < 0.05$),表明玻璃体切割术可引起晶状体 CAT 活性降低,这也说明了玻璃体切割术与晶状体的氧化损伤有关,支持玻璃体切割术后白内障发病机制的氧化损伤学说。谷胱甘肽氧化还原循环是组织抗氧化损伤的重要内源性防御机制。玻璃体切割术后 5 个月,玻璃体切割组较对照组晶状体相比谷胱甘肽还原酶活性下降了 5% ($P < 0.05$),表明玻璃体切割术后晶状体周围氧水平的增加破坏了晶状体谷胱甘肽氧化还原循环引起 GR 活性的下降。

综上所述,本研究结果显示玻璃体切割术可使成年兔晶状体发生生物化学改变,尤其是影响晶状体抗氧化酶系统,说明氧化损伤参与玻璃体切割术后晶状体的改变,对研究玻璃体切割术后白内障的发生发展机制提供了重要的实验依据。

参考文献

- 刘晓萃,王萍,严宏.玻璃体切除术后非直接损伤导致白内障的形成机制和防治对策[J].眼科学报,2007,23(4):252-256
- Fitch CL, Swedberg SH, Livesey JC. Measurement and manipulation of the partial pressure of oxygen in the rat anterior chamber[J]. Curr Eye Res, 2000, 20(2): 121-126
- Shui YB, Beebe DC. Age-dependent control of lens growth by hypoxia [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(3): 1023-1029
- Holekamp NM, Shui YB, David C, et al. Vitrectomy surgery increases oxygen exposure to the lens: A possible mechanism for nuclear cataract formation [J]. Am J Ophthalmol, 2005, 139(2): 302-310
- Marsili S, Salganik RI, Albright CD, et al. Cataract formation in a strain of rats selected for high oxidative stress [J]. Exp Eye Res, 2004, 79(5): 595-612

6 Paterson CA, Delamere NA. ATPases and lens ion balance [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78(3): 699 - 703

7 Duncan G, Hightower KR, Gandolfi SA, et al. Human lens membrane cation permeability increases with age [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989, 30(8): 1855 - 1859

8 Melberg NS, Thomas MA. Nuclear sclerotic cataract after vitrectomy in patients younger than 50 years of age [J]. *Ophthalmology*, 1995, 102(10): 1466 - 1471

9 Huang WH, Wang Y, Askari A. Na⁺-K⁺-ATPase; inactivation and degradation induced by oxygen radicals [J]. *Int J Biochem*, 1992,

24(4): 621 - 626

10 John M, Jaworski C, Chen Z, et al. Matrix metalloproteinases are down-regulated in rat lenses exposed to oxidative stress [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 79(6): 839 - 846

(收稿: 2009-05-06 修回: 2009-06-15)

(本文编辑: 高 红)

· 病例报告 ·

互隔交链孢霉性真菌性角膜炎一例

李菊枝 孙声桃 李 金 胡志民 岳 娟 韩 雷

患者,女,57岁。20 d前修剪苹果树时右眼被树枝扎伤后出现疼痛、畏光、流泪、视力减退,在当地静脉滴注青霉素钾 800 万 U,每日 1 次,同时用 0.3% 氧氟沙星滴眼液频繁点眼 2 周,效果不佳,于 2009 年 3 月 10 日到河南省眼科研究所就诊,视力为右眼指数/1 m,左眼 1.0。裂隙灯显微镜检查见结膜中度混合性充血,瞳孔中央稍偏颞下方角膜可见 4 mm × 5 mm 密度不均的白色溃疡,边缘模糊(图 1)。角膜刮片 10% KOH 湿片及吉姆萨染色可见大量真菌菌丝,直径 4.5 ~ 10 μm,锐角或直角分支外尚有较多厚垣孢子,直径 11 ~ 20 μm, HRT3 显示自角膜表面至角膜内 57 μm,粗细不均且呈锐角或直角分支的线型高反光真菌菌丝,在病灶中心及边缘浸润生长(图 2)。在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上以 26 ~ 28 °C 培养 3 d 可见直径 3 cm 的圆形绒毛状菌落,中心呈墨绿色粉末状,边缘呈白色,放射状生长。在马铃薯葡萄糖琼脂平板上小培养 3 d 的菌落一侧平放无菌盖玻片,7 d 后观察,可见菌落长满整个培养基,直径约 10 cm(图 3)。此时无菌操作下夹出盖玻片,置于滴有中性树胶的载玻片上,显微镜下观察。小培养显示真菌菌丝呈棕色,球拍样、砖墙分隔的分生孢子在较短的棕色分生孢子梗末端链状生长,鉴定为互隔交链孢霉。Etest 真菌药敏试验结果显示 5-氟胞嘧啶:耐药(R),最低抑菌质量浓度(MIC) ≥ 32 μg/mL;氟康唑:敏感(S),MIC ≤ 8 μg/mL;二性霉素 B:敏感(S),MIC ≤ 1 μg/mL;

制霉菌素:敏感(S),MIC ≤ 4 μg/mL;益康唑:敏感(S),MIC ≤ 1 μg/mL;伏立康唑:敏感(S),MIC ≤ 1 μg/mL;克霉唑:敏感(S),MIC ≤ 1 μg/mL;酮康唑:敏感(S),MIC ≤ 1 μg/mL;咪康唑:敏感(S),MIC ≤ 1 μg/mL;伊曲康唑:敏感(S),MIC ≤ 0.125 μg/mL;特比奈芬:敏感(S),MIC ≤ 1 μg/mL。给予患者 0.1% 二性霉素 B 滴眼液、3% 酮康唑滴眼液交替点眼,每日 4 次。1 个月后电话随访,患者述无疼痛、畏光、流泪,在当地医院复查患眼上皮生长,形成白斑,右眼视力 0.4,停药。

讨论:互隔交链孢霉是一种腐生真菌,在空气、灰尘中及植物上大量存在,互隔交链孢霉所致的真性角膜炎在我省统计中位列镰孢菌、曲霉、无孢霉之后,居第 4 位^[1],但因为无孢霉菌包括了很多种属的真菌,实际上互隔交链孢霉应居于第 3 位。

互隔交链孢霉菌的菌丝在角膜刮片中很特异,培养后的特征明显,与孙声桃等^[2]的报道相同,故未再显示刮片及培养结果图。但该真菌对多种广谱抗真菌药物敏感,可以通过药物治疗或者板层角膜病灶切除达到治愈^[2]。该病例证明了这种特征,二性霉素 B、酮康唑滴眼液治疗 1 个月痊愈,与 Zahra 等^[3]单纯用二性霉素 B 治愈该种角膜炎报道相似。互隔交链孢霉在角膜刮片中有相对特异的菌丝形态,可推测感染菌种,对患者的治疗和预后有很大帮助。

本文首次报道了互隔交链孢霉性角膜炎中真菌菌丝在激光共焦显微镜下的表现,丰富了活体状态下真菌形态的知识库,对该种真菌性角膜炎发病机制的研究也将提供很大帮助。

该种真菌的鉴定采用在马铃薯葡萄糖琼脂平板上直接加盖盖玻片,真菌自然生长一段时间后直接观察真菌的生长状态,简化了小培养的手续,对真菌的小培养方法也是一种改进。

参考文献

1 孙声桃,王印其. 中原地区真菌性角膜炎患病因素调查 [J]. *眼科研究*, 2007, 25(11): 884 - 886

2 孙声桃,王丽娅,徐筠,等. 互隔交链孢霉真菌性角膜炎的临床与病原学研究 [J]. *中华眼科杂志*, 43(1): 32 - 35

3 Zahra LV, Mallia D, Hardie JG, et al. Case report. Keratomycosis due to *alternaria alternata* in a diabetic patient [J]. *Mycoses*, 2002, 45(11 - 12): 512 - 514



图 1 患眼 HRT3 镜下表现 图 2 真菌的小培养观察

作者单位: 450003 郑州, 河南省眼科研究所 河南省角膜病重点实验室(李菊枝, 现在巩义市卫生防疫站 451200)
通讯作者: 孙声桃 (Email: sunshengtao@sina.com)

(收稿: 2009-04-15)

(本文编辑: 尹卫靖)