

# 双氯芬酸钠水分离对晶状体上皮细胞融合的影响

姚勇 徐慧艳 黄红宇 蔡颖 谈旭华 刘丽霞

## Effect of hydrodissection with diclofenac sodium on coverage time of lens epithelial cells

Yao Yong, Xu Huiyan, Huang Hongyu, Cai Ying, Tan Xuhua, Liu Lixia. Department of Ophthalmology, The Hospital of Wuxi City, Wuxi 214023, China

**Abstract Objective** Posterior capsular opacity (PCO) arises from lens cells that remain associated with the lens capsule after cataract surgery and proliferate and migrate into the visual pathway. Our study was to evaluate the effect of hydrodissection with diclofenac sodium and nuclear rotation on the coverage time of lens epithelial cells. **Methods** The posterior capsular membranes of lens were obtained from 40 pig eyes and divided into four groups according to different operating methods as follows: PBS hydrodissection group, diclofenac sodium + lidocaine hydrodissection group, 0.25 mg/mL diclofenac sodium group, 0.25 mg/mL diclofenac sodium + nuclear rotation group. The lens capsular membrane was cultured in DMEM containing 10% bovine serum to collect the lens epithelial cells. The proliferation and differentiation of the cells were examined and the coverage time was evaluated. **Results** The coverage time among four groups was significantly different ( $F = 37.639, P = 0.000$ ). The significant differences in coverage time of lens epithelial cells were found between diclofenac sodium group and diclofenac or nuclear rotation group and control group ( $P = 0.009, P < 0.01$ , respectively), and the coverage time of lens epithelial cells also was considerably different between diclofenac sodium group and diclofenac or nuclear rotation group ( $P < 0.01$ ). These results demonstrated a significant prolong in diclofenac sodium group and diclofenac and nuclear rotation group compared with control group. The shrink of cell nuclear was observed in PBS group and much less survival cells in diclofenac + lidocaine group. **Conclusion** Hydrodissection with diclofenac sodium alone or along with nuclear rotation could prolong the coverage time of pig lens epithelial cells and inhibit the cell proliferation, and thus it maybe postpone the development of PCO.

**Key words** lens epithelial cells; coverage time of cells; posterior capsular opacity; diclofenac sodium

**摘要 目的** 研究双氯芬酸钠水分离及联合转核技术对残留后囊膜上的晶状体上皮细胞(LECs)融合的影响。**方法** 将猪眼后囊膜 LECs 进行体外原代培养,分为对照组、加药组(双氯芬酸钠水分离)、加药转核组(双氯芬酸钠水分离联合核旋转),观察 LECs 不同时期的增生、分化、融合情况及各组细胞的融合时间。**结果** 加药组和加药转核组的细胞融合时间较对照组延长,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),加药组的细胞出现核固缩现象,加药转核组残留细胞团明显减少。**结论** 双氯芬酸钠水分离能延缓后发性白内障(PCO)的发生,双氯芬酸钠水分离联合转核能有效降低 PCO 的发生率。

**关键词** 晶状体上皮细胞; 细胞融合时间; 后发性白内障; 双氯芬酸钠

**分类号** R 776 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)10-0874-04

后发性白内障 (posterior capsular opacity, PCO) 是白内障囊外摘出联合人工晶状体植入术的常见并发症。十几年来学者们一直致力于研究如何降低 PCO 的发生率,随着白内障手术技术及人工晶状体设计的日臻完善,使得 PCO 的发生率从 50% 降至 15% 左右<sup>[1]</sup>。

白内障术中、术后如何使用药物更好地控制 PCO 的发生率成为目前的研究热点。双氯芬酸钠是第 3 代非甾体抗炎药, Nishi 等<sup>[2]</sup> 发现其能抑制晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 的增生和化生,从而抑制 PCO 的发生。本课题选择猪 LECs 进行研究,参照 Nishi 等<sup>[2]</sup> 的双氯芬酸钠的浓度,通过双氯芬酸钠对 LECs 充分水分离后,从病理及细胞学方面观察双氯芬酸钠对猪眼 LECs 的形态、增生分化的过程及融合时

作者单位: 214023 无锡市人民医院眼科(姚勇); 214002 无锡市第二人民医院眼科(徐慧艳、黄红宇、蔡颖、谈旭华、刘丽霞)

通讯作者: 姚勇 (Email: pard1@126.com)

间的影响,并联合转核技术,研究其对 PCO 防治方面的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

新鲜猪眼球 40 只取自无锡市朝阳农贸市场。胎牛血清(杭州四季青公司);DMEM(美国 Gibco 公司);注射用双氯芬酸钠盐酸利多卡因(75 mg:25 mg,海南双成药业有限公司)。CK40 倒置显微镜、BX41 光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及后囊膜的取出** 参照 Hamilton 等<sup>[3]</sup>猪 LECs 培养的方法,将 40 只新鲜猪眼球随机分为 4 组,每组 10 只眼,用 75% 乙醇消毒 3 遍,无菌生理盐水充分冲洗,无菌条件下对猪眼球实施透明角膜切口、连续环形撕囊。对照组 A:用 PBS 充分水分离,行超声乳化晶状体吸除;对照组 B:用 0.08 mg/mL 利多卡因稀释液水分离,行超声乳化晶状体吸除;加药转核组:用 0.25 mg/mL 双氯芬酸钠稀释液充分水分离,行超声乳化晶状体吸除;加药转核组:用 0.25 mg/mL 双氯芬酸钠稀释液充分水分离,双手法将核按顺时针和逆时针方向各旋转 3 圈,行超声乳化晶状体吸除。4 组猪眼球均自睫状体平坦部剪开眼球,剪断晶状体悬韧带,撕取完整的晶状体囊袋(包括后囊膜、赤道部和残留的前囊)。

**1.2.2 LECs 的培养**<sup>[4]</sup> 将囊袋细胞面朝上平铺在培养瓶底部,将培养瓶竖起,小心加入含 10% 小牛血清的 DMEM 液,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱,1 h 后将培养瓶放平,晶状体囊膜已紧贴培养瓶底部,对其进行培养,每 24 h 观察 1 次,光学显微镜观察各个生长时期的细胞并拍照,观察各组 LECs 的融合时间。

**1.2.3 病理观察** 另取各组 5 只眼球,按上述方法取得晶状体后囊膜后,用显微无齿镊将晶状体后囊膜平铺于载玻片上,用甲醇固定 30 min 后,蒸馏水漂洗 2~3 次,苏木精-伊红染色 10~15 min,自来水漂洗 3~4 次后,光学显微镜观察并拍照。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计学软件对数据进行统计学分析。LECs 培养后的融合时间以  $\bar{x} \pm s$  表示。4 个组后囊膜 LECs 融合时间的比较采用完全随机设计的单因

素方差分析,组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组后囊膜 LECs 融合时间

4 组后囊膜 LECs 融合时间比较差异有统计学意义( $F = 37.639, P = 0.000$ )。组间两两比较:对照组 A 与对照组 B 差异无统计学意义( $P = 0.873$ );加药组与对照组 A 差异有统计学意义( $P = 0.009$ );加药转核组与对照组 A 差异有统计学意义( $P < 0.01$ );加药转核组与加药组差异有统计学意义( $P < 0.01$ )(表 1)。

表 1 4 组 LECs 融合时间的比较( $\bar{x} \pm s, d, n = 10$ )

Table 1 Comparison of LECs' coverage time in four groups( $\bar{x} \pm s, d, n = 10$ )

Group	Coverage time(d)
PBS	26.00 ± 2.98
Diclofenac + lidocaine	26.20 ± 3.36 <sup>a</sup>
Diclofenac sodium	29.60 ± 2.95 <sup>a</sup>
Diclofenac and nuclear rotation	37.50 ± 1.35 <sup>af</sup>
<i>F</i>	37.639
<i>P</i>	0.000

<sup>a</sup> $P > 0.05$ , <sup>a</sup> $P < 0.01$  vs PBS group, <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs diclofenac sodium group (One-way ANOVA, SNK-*q* test)

### 2.2 后囊膜 LECs 的形态学观察

培养 24 h 后,倒置显微镜下发现 2 个对照组可见赤道部 LECs 开始“串珠样”向中央区生长(图 1),14 h 时 LECs 呈梭形,成纤维样化生,部分后囊膜皱缩(图 2)。

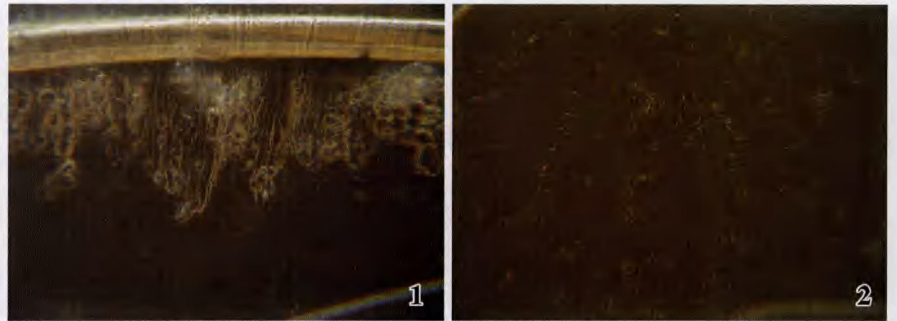


图 1 培养 24 h 可见赤道部 LECs 开始“串珠样”生长( $\times 100$ ) 图 2 培养 14 d 细胞增生,可见成纤维样化生,后囊膜皱缩( $\times 100$ )

Fig.1 The lens epithelial cells at equator formed pearl-like growth in 24 hours after culture( $\times 100$ )

Fig.2 Proliferation and fibrous metaplasia of lens epithelial cells as well as capsule shrank were seen in 14 days after culture( $\times 100$ )

### 2.3 后囊膜 LECs 的病理学形态

对照组 A 及对照组 B 后囊经苏木精-伊红染色后发现,后囊膜上有成团的 LECs,上皮细胞核饱满(图

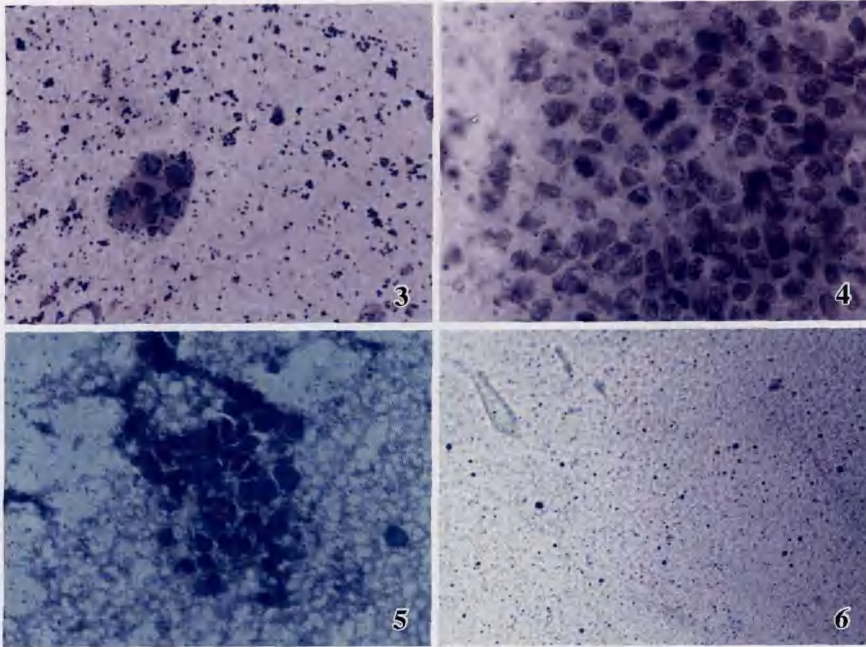


图3 对照组 A 的后囊膜 LECs 核饱满(×400) 图4 对照组 B 的后囊膜 LECs 核饱满(×400)  
 图5 加药组的后囊膜 LECs 出现核固缩、边集现象(×400) 图6 加药转核组显示无明显的细胞团(×200)  
**Fig. 3** The nucleus of lens cells in PBS group were full(×400) **Fig. 4** The nucleus of lens cells in diclofenac + lidocaine group were full(×400) **Fig. 5** The nucleus of lens cells in drug group show shrank and vergence(×400) **Fig. 6** There are a fewer cells in diclofenac + nuclear rotation group(×200)

3,4);加药组的后囊膜 LECs 则出现核固缩、边集现象(图5);加药转核组发现后囊膜上无明显的 LECs 团,扩大视野范围仍未发现明显的细胞团(图6)。

### 3 讨论

正常人 LECs 位于前囊下、赤道部及赤道弓部,单层立方上皮,分为3个生物活性区域:中央区、赤道前区和赤道区,成人多数有丝分裂发生于赤道前区的 LECs<sup>[5-6]</sup>。白内障囊外摘出术后,LECs 移行、增生和向成纤维细胞转化失去单层性,并在增生的过程中合成胶原及炎性因子,如 IL-1、IL-6、PGE 等,加重 PCO 的形成<sup>[3]</sup>。Apple 等<sup>[1]</sup>从手术技术和人工晶状体方面总结了降低 PCO 的六大因素:(1)充分水分离清除晶状体皮质。(2)人工晶状体植入囊袋内。(3)撕囊口直径略小于人工晶状体光学部直径,前囊 360°包裹人工晶状体。(4)人工晶状体的材质,不刺激或能抑制 LECs 的增生。(5)人工晶状体光学部和后囊最大面积的接触。(6)人工晶状体光学部的边缘阻挡效应<sup>[1,7]</sup>。目前,手术技术和人工晶状体的材质设计日臻成熟,已经成功地将 PCO 的发生率控制在 15% 左右,但如何进一步降低 PCO 的发生率,研究热点之一

是在白内障术中、术后应用药物抑制或破坏 LECs 的增生,如组织型纤维酶原激活剂(r-tPA)、全反式维甲酸(atRA)等。双氯芬酸钠化学名为邻-(2,6-氯苯氨基)-苯乙酸钠,国内 1985 年合成,临床用于消炎、镇痛、解热和抗风湿等,在同类药物中具有疗效好、不良反应小、长期应用无蓄积性等优点<sup>[8]</sup>,被证实可以抑制血-房水屏障的崩解、抑制 PGE<sub>2</sub> 的合成,且对眼内组织无毒性<sup>[9-10]</sup>,但国内外关于双氯芬酸钠对 PCO 防治方面的基础和临床报道较少。中山眼科中心用基因法鉴定了猪晶状体前极部及赤道部均存在上皮细胞,但转录水平上差异明显,表明猪晶状体赤道部的上皮细胞分裂活跃,与人相似<sup>[11]</sup>,故本研究选择猪眼 LECs 为研究对象,并在手术时加入了双手法转核技术,研究对 PCO 防治的影响。

Symonds 等<sup>[12]</sup>研究了地塞米松和双氯芬酸钠对大鼠 LECs 的影响,

发现地塞米松和双氯芬酸钠能明显导致大鼠 LECs 的异常,认为这提示可以通过药物影响 PCO 的发生率;Inan 等<sup>[13]</sup>观察了临床上用 0.25 mg/mL 双氯芬酸钠稀释液充分水分离后降低了 PCO 的发生率,但不能起到预防作用;而 Neumayer 等<sup>[14]</sup>则通过 2 周的短期观察认为双氯芬酸钠并不能减少后囊上珍珠样小体的发生。本研究发现利用双氯芬酸钠稀释液进行水分离后,LECs 发生核固缩及边集现象,从病理上解释了双氯芬酸钠可能抑制 LECs 产生炎性因子,同时观察到双氯芬酸钠组的 LECs 的融合时间延长,说明双氯芬酸钠能降低 PCO 的发生率,但临床效果还需进一步研究。同时本研究发现转核技术可以有效地清除 LECs,双氯芬酸钠水分离联合转核可进一步降低 PCO 的发生率。

孙考祥等<sup>[15]</sup>研究了 0.1% 双氯芬酸钠滴眼液在眼内的组织分布,房水中的峰质量浓度为 (0.30 ± 0.12)mg/mL,故本研究选择 0.25 mg/mL 是安全的,同时实验结果表明 0.25 mg/mL 的质量浓度能有效降低 PCO 的发生率,目前我们临床上正在观察 0.25 mg/mL 的双氯芬酸钠水分离对人 PCO 的抑制作用。

### 参考文献

1 Apple DJ, Peng Q, Visessook N, et al. Surgical prevention of posterior

- capsule opacification. Part 1: progress in eliminating this complication of cataract surgery [J]. J Cataract Refract Surg, 2000, 26: 180 - 187
- 2 Nishi K, Nishi O. Tissue culture of human lens epithelial cells. Part II: Suppressive effect of diclofenac sodium on their proliferation and metaplasia [J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1991, 95 (6): 581
  - 3 Hamilton PD, Ravi N. Effect of chelating agents on porcine lens epithelial cell growth in vitro [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 452
  - 4 Bermbach G, Mayer U, Naumann GO, et al. Human lens epithelial cells in tissue culture [J]. Exp Eys Res, 1991, 52: 113 - 119
  - 5 Shan SM, Spalton DJ. Changes in anterior chamber flare and cells following cataract surgery [J]. Br J Ophthalmol, 1994, 78: 91 - 94
  - 6 Font RL, Brownstein S. A light and electron microscopic study of anterior subcapsular cataracts [J]. Am J Ophthalmol, 1994, 78: 972 - 984
  - 7 Miyata K, Kato S, Nejima R, et al. Influences of optic edge design on posterior capsule opacification and anterior capsule contraction [J]. Acta Ophthalmol Scand, 2007, 85 (1): 99 - 102
  - 8 McEvog A, Livingstone J, Cahill C. Comparison of diclofenac sodium and morphine sulphate for postoperative analgesia after day case inguinal hernia surgery [J]. Ann R Coll Surg Engl, 1996, 78 (4): 363 - 366
  - 9 Demco TA, Autton H, Demco CJ, et al. Topical diclofenac sodium compared with prednisolone acetate after phacoemulsification-lens implant [J]. Surg Eur J Ophthalmol, 1997, 7 (3): 236 - 240
  - 10 Seki T, Yabe N, Kawashima C, et al. Long-term efficacy of diclofenac sodium after PEA and IDJ surgery [J]. Foha Ophthalmol Jpn, 1992, 43: 1452 - 1456
  - 11 马璇, 吴明星, 张艳莉, 等. 不同区域晶状体上皮细胞基因表达差异分析 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2006, 27 (5): 553 - 557
  - 12 Symonds JG, Lovicu FJ, Chamberlain CG. Differing effects of dexamethasone and diclofenac on posterior capsule opacification-like changes in a rat lens explant model [J]. Exp Eye Res, 2006, 83 (4): 771 - 782
  - 13 Inan UU, Bozkurt E, Ozturk F, et al. Effect of diclofenac on prevention of posterior capsule opacification in human eyes [J]. Can J Ophthalmol, 2006, 41 (5): 624 - 629
  - 14 Neumayer T, Buehl W, Findl O. Effect of topical prednisolone and diclofenac on the short-term change in morphology of posterior capsular opacification [J]. Am J Ophthalmol, 2006, 142 (4): 550 - 556
  - 15 孙考祥, 彭绍民. 双氯酚酸钠滴眼液的眼内组织分布及药代动力学 [J]. 中国临床药理学杂志, 2001, 17 (2): 118 - 120

(收稿: 2008-12-15 修回: 2009-08-20)

(本文编辑: 王莉红)

消息



### 视光学组学术会议通知

中华医学会眼科学分会视光学组 2009 年学术会议于 2009 年 12 月 4—6 日在中国广州番禺星河湾酒店和亚洲最大的长隆主题公园举行。本次年会将就视光学的激光视力矫正前后、隐形眼镜、近视眼、低视力和验光配镜等热点问题和最新进展进行广泛交流。

十二月是广州天气最好的时候, 加上享誉全球的粤菜美点, 大会组委会诚挚邀请各位专家、同道和相关企业参加此次集交流和娱乐于一体的盛会。

投稿注册和旅游等请联系: 会议秘书处、中山眼科中心曾骏文教授 (020 - 87330351 或 zeng163net@163.net), 详情请登陆 [www.chinaoptometry2009.org](http://www.chinaoptometry2009.org)。

(会务组)

