

EDTA 与多聚赖氨酸的铰链物抑制兔后发性白内障的实验研究

包煜芝¹, 张海燕²

基金项目: 中国贵州省科技攻关资助项目 [No. 黔科合 SY 字 (2009)3089]

作者单位: ¹(409000) 中国重庆市, 重庆黔江民族医院眼科中心; ²(550004) 中国贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院眼科

作者简介: 包煜芝, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 张海燕, 女, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障. bbw040428@163.com

收稿日期: 2011-11-11 修回日期: 2012-02-09

Experimental study of EDTA and poly-L-lysine hinge inhibiting after cataract in rabbit

Yu-Zhi Bao¹, Hai-Yan Zhang²

Foundation item: Scientific and Technological Project of Guizhou Province, China [Qian Ke He SY Zi No. (2009)3089]

¹Eye Center, Chongqing Qianjiang National Hospital, Chongqing 409000, China; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Correspondence to: Hai-Yan Zhang, Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. bbw040428@163.com

Received: 2011-11-11 Accepted: 2012-02-09

Abstract

• AIM: To explore the effect of EDTA and poly-L-lysine hinge on the rabbit after cataract (PCO) in the prevention and treatment role.

• METHODS: Forty eyes of twenty New Zealand white rabbits were randomly divided into A, B, C and D groups. The operations of extracapsular transparent lens extraction were performed on rabbit eyes in each group. Group A, the control group, was irrigated only with balanced salt solution (BSS) during operation. Group B, C, D, the treatment groups, were irrigated with diluted BSS of 10mg/L EDTA, poly-L-lysine, and EDTA and poly-L-lysine hinge. The opacity in posterior lens capsule was observed by routine examination after operation. Two months later, the densities of lens epithelial cells (LECs) in the four groups were calculated through hematoxylin and eosin (HE) staining. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and their expression were identified through immunohistochemical staining, and the average optical density (gray value OD) of PCNA expression was detected with medical image analysis system.

• RESULTS: After HE staining, the posterior capsule LECs

density in group B, D was less than that in group A, C, and group D less than group B, the statistical analysis were significantly different ($P < 0.01$); statistical analysis was no significant difference between group A and C ($P > 0.05$). For the average optical density (gray) measured, PCNA expression in group A and group C were strongly positive, group B was partially positive, positive expression in group D was still less than that in group B. Statistical analysis of group B, D and group A, group B and D were significant difference ($P < 0.01$). Group A and group C were no significant difference ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: In rabbits *in vivo*, EDTA, poly-L-lysine and EDTA hinge all have functions of inhibiting the proliferation of rabbit LECs, preventing and delaying the formation of PCO. Group D is superior to group B on inhibition of LECs, LECs inhibition of group C is not obvious.

• KEYWORDS: EDTA; EDTA and poly-L-lysine hinge; poly-L-lysine; lens epithelial cells; after cataract; animal experiments

Bao YZ, Zhang HY. Experimental study of EDTA and poly-L-lysine hinge inhibiting after cataract in rabbit. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(3):397-399

摘要

目的: 探讨 EDTA 与多聚赖氨酸的铰链物对兔后发性白内障的防治作用。

方法: 将 20 只新西兰白兔 40 眼随机分为 A, B, C, D 共 4 组, 4 组均行透明晶状体囊外摘除术。A 组为对照组, 术中灌注液为 BSS; B, C, D 组为治疗组, 术中灌注液分别为浓度为 10mg/L 的 EDTA、多聚赖氨酸、EDTA 与多聚赖氨酸的铰链物的 BSS 溶液。2mo 后行晶状体后囊膜切片, HE 染色统计晶状体上皮细胞 (LECs) 的密度; 并行免疫组织化学染色, 用医学图象分析系统检测 PCNA 表达平均光密度 (灰度值 OD)。

结果: 经 HE 染色, 后囊膜 LECs 密度 B 和 D 组较 A 和 C 组少, 且 D 组的 LECs 密度小于 B 组, 均有显著性差异 ($P < 0.01$); A 和 C 组的 LECs 密度相差不大, 无统计学差异 ($P > 0.05$)。免疫组织化学进行平均光密度测定, A 和 C 组 PCNA 表达强阳性, B 组呈部分阳性表达, D 组阳性表达较 B 组更少。B 和 D 组与 A 组、B 组与 D 组均有显著性意义 ($P < 0.01$)。A 组和 C 组无显著差异性 ($P > 0.05$)。

结论: 在活体兔眼中, EDTA、多聚赖氨酸与 EDTA 的铰链物均有抑制兔 LECs 增殖的作用, 且 EDTA 与多聚赖氨酸的铰链物组对 LECs 的抑制作用优于 EDTA 组, 多聚赖氨酸组对 LECs 的抑制作用不明显。

关键词:EDTA;EDTA与多聚赖氨酸的铰链物;多聚赖氨酸;晶状体上皮细胞;后发性白内障;动物实验
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.03.06

包焯芝,张海燕. EDTA与多聚赖氨酸的铰链物抑制兔后发性白内障的实验研究. 国际眼科杂志 2012;12(3):397-399

0 引言

后发性白内障(after cataract)即后囊膜混浊(posterior capsule opacification,PCO),是白内障囊外摘除或不伴人工晶状体(intraocular lens,IOL)植入术后影响视力最常见的原因。PCO的发生率较高,严重影响了白内障术后患者的生活质量^[1]。目前还没有确切有效的防治PCO的方法^[2],近几年来虽然随着人工晶状体材料不断更新和晶状体形态设计的改良、无创性手术操作技巧的日臻完美,以及术中采取一些相应措施(包括连续环形撕囊、充分水分离、前囊下和后囊抛光、人工晶状体囊袋内植入、儿童白内障术中后囊切开等)和术后积极应用抗炎药物等,使得后发性白内障的发生率有所降低。但统计资料显示结果仍不尽人意,Schaumburg等^[3]总结了1996/2006年Medline光盘中囊括的相关文献,得出以下结论:后发性白内障的发病率术后1,3,5a分别为11.8%,20.7%,28.4%。Javitt等^[4]报道PCO的发生高峰在术后3~5a,成人约为15%~50%,儿童几乎达100%。而国内有报道^[5]小于12岁儿童的后发性白内障发生率为97%,发生时间在术后3mo,最早者可发生在术后1mo。目前比较理想的治疗方法是YAG激光后囊切开术^[6],但是即使手术后很长一段时间后囊中央保持透明,但前部囊膜切开口边缘或后囊周边部的混浊仍可妨碍行周边眼检查和激光治疗视网膜病变;且不可避免产生一些并发症,如暂时性的房水混浊、虹膜出血、虹膜炎、眼压升高等,长期性的人工晶状体损伤、玻璃体前膜破裂、黄斑囊样水肿和视网膜脱离等,造成严重视力损害^[4],以及婴幼儿患者不能配合激光治疗等。针对引起PCO的原因,寻求适当的药物防治措施仍是当今研究的热点之一。目前研究较多的是抗代谢类药物的应用,虽然能有效地抑制LECs的增殖和迁徙,但由于大多数抗代谢药物无特异性,对眼内其他组织毒性较大,因而限制其临床应用。因此寻求既可延缓或防治PCO的形成而毒副作用又小的药物是亟待解决的重要课题。本实验用多聚赖氨酸、EDTA及二者的铰链物在行兔白内障囊外摘除术(ECCE)时行囊袋内灌注,用PCNA对增殖的上皮细胞进行标记,以观察3种药物对晶状体后囊上皮细胞增殖的抑制情况,探讨一种有效抑制后发性白内障的方法。

1 材料和方法

1.1 材料 选用纯种健康新西兰白兔20只,兔龄2mo,体质量相近,雌雄兼用,由贵阳医学院标准实验动物中心提供。伊红染色剂,苏木素染色剂,PCNA(增殖细胞核抗原)免疫组织化学试剂盒,DAB(联苯二胺)显色剂(博士德生物技术开发公司)等。

1.2 方法 将兔完全随机抽样,先将兔眼编号1~40,如一只兔的右眼编为1号则左眼为2号并以此类推;输入SPSS医学统计软件包并随机分为A,B,C,D共4组,每组10眼,A组为对照组,术中灌注液为BSS;B,C,D组为治疗组,术中灌注液分别为浓度为10mg/L的EDTA、多聚赖氨酸,EDTA与多聚赖氨酸的铰链物的BSS溶液(利用EDC

表1 各组后囊膜PCNA平均光密度值 $\bar{x} \pm s$

组别	n(眼)	平均光密度	q	P
A组	10	127.88 ± 1.82 ^{a,b}		
B组	10	109.40 ± 6.65 ^d	10.0862	<0.01
C组	10	129.43 ± 2.31	0.8459	>0.05
D组	10	82.90 ± 9.01	24.5492	<0.01

^aP>0.05 vsC组;^bP<0.01 vsB和D组;^dP<0.01 vsC和D组。

将EDTA与多聚赖氨酸结合,制成铰链物PLE)。兔子全身麻醉后行透明角膜切口,连续环形撕囊,水分离晶状体皮质,双枪管注吸出晶状体皮质(手术均由同一个人完成,不植入人工晶状体),A组用BSS,B组用EDTA,C组用多聚赖氨酸,D组用EDTA与多聚赖氨酸的铰链物溶液进行灌注,使灌注液保留在前房及囊袋内(这样可保持药物的充分作用时间,虽手术时间的长短稍有差异,相对药物在囊袋内的存留时间,可忽略不计)。术后2mo处死兔子,摘除眼球,沿矢状面方向将眼球一分为二,将其中一半眼球立即放于100mL/L甲醛溶液固定,固定24h后石蜡包埋,病理切片,据博士德生物技术有限公司推荐的免疫组织化学SP法作免疫组织化学染色,DAB显色后用苏木素复染,封片后用计算机病理图像分析仪计算晶状体增殖上皮细胞的平均光密度值。将剩下的一半眼球置于空气中自然干燥10min。甲醇固定20min,石蜡包埋,病理切片后HE染色。

统计学分析:采用SPSS 11.5医学统计软件包统计分析,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组均数比较采用单因素方差分析和SNK-q检验,P<0.05表示有统计学差异。

2 结果

2.1 后囊膜HE染色检测LECs的密度 后囊膜行HE染色后,光镜下细胞计数,计算每片3个视野面积的上皮细胞数,取其平均值:B组的细胞数(30.60 ± 3.37个/HP)较A组(60.20 ± 5.32个/HP)、C组(58.80 ± 3.82个/HP)少(P<0.01);D组(16.30 ± 3.59个/HP)细胞数较B组少(P<0.01);D组细胞数较A组和C组少(P<0.01);A组和C组细胞数相差不明显,无统计学差异(P>0.05)。

2.2 后囊膜免疫组织化学检测PCNA的表达 后囊膜免疫组织化学测定结果为PCNA阳性为棕黄色,定位于细胞核,A组和C组PCNA强阳性表达;B组和D组PCNA出现程度不等的弱阳性(色暗)或阴性表达。计算机图像分析测其平均光密度(灰度值),经统计学分析,A组与B,D组;B组与C,D组;C组与D组间均有统计学差异(P<0.01)。A组和C组无统计学差异(P>0.05,表1)。

3 讨论

3.1 PCO的发生机制 PCO是白内障患者手术后的主要并发症,是患者术后视力再度下降的主要原因,严重影响了患者的生活质量,PCO的发生机制是一个相当复杂的机体损伤修复反应,为各种因素综合作用的结果,其具体机制尚未完全阐明,一般认为ECCE后,残留的前囊膜下及靠赤道部LECs失去了“接触抑制”,转化为纤维细胞,大量增殖并向后囊迁徙,并分泌大量胶原沉积晶状体后囊膜形成PCO^[10]。

3.2 后囊膜的细胞密度及意义 PCO发生的快慢及严重程度主要与LECs增殖的快慢及细胞数量有关,因此统计晶状体后囊膜LECs密度,客观、直接地反应出LECs增殖

程度及 PCO 的严重性。细胞数量多、密度大,说明 LECs 增殖活跃;细胞密度较小,说明 LECs 增殖程度相对较弱。

3.3 PCNA 表达及意义 PCNA 是一种仅在增殖细胞中合成表达的核内多肽,是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,是 DNA 复制的必需物质,其分子量为 36000kD 的酸性非组织蛋白,表达和合成与细胞周期有关。较高的 PCNA 表达率反映了高水平的细胞增殖状态,是增殖的细胞核内特异性强的一抗原。PCNA 的合成和表达与细胞的增殖状态有关。Watanabe 等^[11]报道抗青光眼术后(滤过术)伤口修复过程中 PCNA 染色阳性,证明有明显的细胞增殖。同样 PCNA 是检测 LECs 增殖的一个敏感指标^[12,13]。本实验显示对照组的 PCNA 强阳性表达,显示 LECs 增殖活跃,而治疗组 B 组和 D 组 PCNA 表达弱阳性或阴性,表示其增殖欠活跃或处于非增殖状态。

3.4 EDTA 对 LECs 的作用及机制 EDTA 是常用的金属离子螯合剂,是一种化学螯合物,可能通过影响酶中心 Cu^{2+} 功能而降低酶活性。较高浓度的 Cu^{2+} 对酶表现为抑制作用,且抑制程度随着外加 Cu^{2+} 浓度的增大而增大,其原因可能是过量的 Cu^{2+} 参与了酶活性中心外的其他基团的相互作用,导致酶活力下降。此结果与江津津等^[14]报道 Cu^{2+} 对乌贼墨酶活性的影响相似。综上所述,EDTA 可与多种金属离子进行螯合,降低酶的生物活性,抑制细胞的增殖。

3.5 多聚赖氨酸在本实验中的作用 多聚赖氨酸是一种由 20 ~ 35 个赖氨酸残基通过 α -羧基和 ϵ -氨基聚合成的多聚阳离子多肽,它带有强大的正电荷,是一种多价阳离子聚合物。刘彦春等^[15]发现多聚赖氨酸包埋的支架对软骨细胞的吸附力明显增强,且细胞分泌基质增多,提示不仅对细胞有良好的吸附,还有促进细胞发挥正常功能的作用。San Antonio 等^[16]提出多聚赖氨酸通过其所带的阳离子与细胞表面或细胞外基质的特异负离子的交联作用来促进细胞的黏附。本实验就是充分利用多聚赖氨酸可选择性地与 LECs 结合的特性。

3.6 EDTA 与多聚赖氨酸的铰链及其作用 EDTA 是一种化学螯合物,几乎能与大部分金属离子配合,形成具有稳定性较强的配合物;而多聚赖氨酸又是最常用的多聚阳离子多肽,它带有强大的正电荷,是一种多价阳离子聚合物,Bretton 等^[17]研究得出的多聚赖氨酸具有可选择性地与晶状体囊结合的特性。本实验正是充分利用了这两种药物的特性,将二者配成铰链物,让其作用于晶状体上皮细胞,充分发挥两种药物功能,在本实验中多聚赖氨酸充当与晶状体上皮细胞有高亲和性的载体,使 EDTA 能更持久、更充分地、更充分地与晶状体上皮细胞黏附,发挥其抑制上皮细胞增殖的作用,这与 Bretton 等^[17]和 Inan 等^[18]先后对此方面进行的相关实验研究的结果一致。

总之,寻找一种既对眼组织毒副作用小又能持久有效地抑制 LECs 增殖的药物已成为国内外眼科学者研究的热点。但 Power 等^[19]提出眼内使用抑制 LECs 增殖的理想药物必需具备:(1)有效地抑制 LECs 的增殖;(2)对眼内组织无毒副作用,特别是对角膜内皮细胞无影响;(3)药物必须适合注入前房,其有效药物浓度能够维持足够长

的时间。因此我们从防治 PCO 的临床目的出发,选择了对细胞损害较小的 EDTA 作为有效成分;还利用了 Bretton 等的研究结果,将药物选择性作用于晶状体囊膜,增强了作用效果;我们选择用清除 LECs 的方法防治 PCO,并认为此方法损害较小,具有很好的临床应用前景。

参考文献

- 1 Khalifa MA. Polishing the posterior capsule after extracapsular extraction of senile cataract. *J Cataract Refract Surg* 1992;18(2):170-173
- 2 才娜,张劲松,张峰,等. 白内障术后防治晶体后囊混浊方法的研究现状. *中国实用眼科杂志* 1996;14(8):454-459
- 3 Schaumberg DA, Dana MR, Christen WG, et al. A systematic overview of the incidence of posterior capsule opacification. *Ophthalmology* 1998;105(7):1213-1221
- 4 Javitt JC, Tielsch JM, Canner JK, et al. National outcomes of cataract extraction. Increased risk of retinal complications associated with Nd:YAG laser capsulotomy. The Cataract Patient Outcomes Research Team. *Ophthalmology* 1992;99(10):1487
- 5 胡明,惠延年,郝燕生. 先天性白内障人工晶体植入术后视力的影响因素. *中华眼科杂志* 1994;30(3):170
- 6 Song YP, Ding Q, Liu Q, et al. Nd:YAG laser resection to children with after cataract in 50 cases. *Int J Ophthalmol(Guoji Yanke Zazhi)* 2005;5(3):564
- 7 Zhou Y, Tang LS. Nd:YAG laser for treating the after cataract. *Int J Ophthalmol(Guoji Yanke Zazhi)* 2004;4(4):699
- 8 Li YZ, Cai JP. Causes for Posterior capsule opacification. *Int J Ophthalmol(Guoji Yanke Zazhi)* 2004;4(4):695
- 9 Wang L, Li P. Clinical observation in Posterior capsule opacification treatment by Nd:YAG laser. *Int J Ophthalmol(Guoji Yanke Zazhi)* 2005;5(4):768
- 10 Odrich MG, Hall SJ, Worgul BV, et al. Posterior capsule opacification; experimental analyses. *Ophthalmic Res* 1985;17(2):75-84
- 11 Watanabe J, Sawaguchi S, Abe H, et al. Expression of PCNA following filtration surgery in rabbits. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1993;97(11):1274-1278
- 12 翁景宁,张惠蓉. Bcl-2 基因和增殖细胞核抗原在人晶状体上皮细胞中的表达. *中华眼科杂志* 2001;37(3):197-199
- 13 高丹宇,惠延年,吉启安,等. 小儿与老年白内障晶体上皮细胞密度及增殖细胞核抗原表达. *中华眼科杂志* 1998;34(5):355-357
- 14 江津津,戚晓玉,周培根. 乌贼墨多酚氧化酶的部分特性. *上海水产大学学报* 2002;11(4):353-356
- 15 刘彦春,王伟,曹谊林,等. 包埋后的聚羟基乙酸与软骨细胞体外培养实验研究. *中华显微外科杂志* 1998;21(1):36-38
- 16 San Antonio JD, Jackeno O, Yagami M, et al. Polyionic regulation of cartilage development: promotion of chondrogenesis *in vitro* by polylysine is associated with altered glycosaminoglycan biosynthesis and distribution. *Dev Biol* 1992;152(2):323-335
- 17 Bretton RH, Swearingen A. Use of a polylysine-saporin conjugate to prevent posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 1999;25(7):921-929
- 18 Inan UU, Ozturk F, Kaynak S, et al. Prevention of posterior capsule opacification by intraoperative single-dose pharmacologic agents. *J Cataract Refract Surg* 2001;27(7):1079-1087
- 19 Power WJ, Weylan D, Collum LM. Daunomycin as an inhibitor of human lens epithelial cell proliferation in culture. *J Cataract Refract Surg* 1994;20(3):287-290