

# 雷帕霉素对兔眼准分子激光角膜切削术后 haze 的影响

于睿, 高洪莲, 李欣蒙, 刘奇奇, 张磊

引用: 于睿, 高洪莲, 李欣蒙, 等. 雷帕霉素对兔眼准分子激光角膜切削术后 haze 的影响. 国际眼科杂志 2022;22(3):366-372

作者单位: (256600) 中国山东省滨州市, 滨州医学院附属医院眼科

作者简介: 于睿, 滨州医学院在读硕士研究生, 研究方向: 眼视光。

通讯作者: 张磊, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主任医师, 主任. [zhangleisd@263.net](mailto:zhangleisd@263.net)

收稿日期: 2021-01-14 修回日期: 2022-02-09

## 摘要

目的: 探究调节自噬活性对兔眼准分子激光角膜切削术 (PRK) 术后角膜上皮雾状混浊 (haze) 的影响。

方法: 新西兰大白兔 64 只行右眼 PRK 手术后, 根据术后局部用药不同, 随机分为 4 组: 单纯手术组、14 $\mu$ mol/L 二甲亚砜组 (DMSO)、50 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组、100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组, 每组 16 只。根据分组情况, 术后 2h 开始给予上述滴眼液治疗, 每天 3 次, 1 次 1 滴, 持续 7d, 另选取 16 只兔为正常对照组。术后每天用手持裂隙灯显微镜照相系统, 观察兔眼术后炎症反应及角膜上皮愈合情况。裂隙灯显微镜照相系统采集 PRK 术后 1、4wk 时各组兔眼 haze 的形成情况。各组分别于术后 1、4wk 采用空气栓塞法处死 8 只兔子, 摘取角膜组织, 冻存备用。免疫组化检测转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 的表达水平。Real Time-PCR 技术检测自噬因子-5 (ATG5)、自噬因子-12 (ATG12)、B 淋巴细胞瘤基因-2 (Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase3) 基因的相对表达量。

结果: PRK 术后兔眼角膜上皮均在 3~4d 完全愈合, 各组兔眼术后角膜上皮愈合时间比较无差异 ( $F = 0.745, P = 0.530$ )。在观察期间, 各组术后 haze 均于 4wk 时最明显, 单纯手术组和 14 $\mu$ mol/L DMSO 组 haze 症状均较严重, 其次为 50 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组, 100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组 haze 症状较其他组明显减轻, 各组兔眼术后不同时间点 haze 分级比较有差异 (均  $P < 0.05$ )。免疫组化显示, 术后 1、4wk, 单纯手术组和 14 $\mu$ mol/L DMSO 组 TGF- $\beta$ 1、MMP-2 和  $\alpha$ -SMA 的表达均较强, 其次为 50 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组, 100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组较其他组表达明显减弱 (均  $P < 0.05$ )。PCR 法检测显示, 术后 1、4wk, 50、100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组 ATG5、ATG12 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量较单纯手术组和 14 $\mu$ mol/L DMSO 组明显升高 (均  $P < 0.05$ ); 50、100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组 Caspase3 mRNA 相对表达量较单纯手术组和 14 $\mu$ mol/L DMSO 组明显降低 (均  $P < 0.05$ )。

结论: 雷帕霉素可以增强自噬水平, 抑制凋亡水平, 从而减轻兔眼 PRK 术后 haze 的形成。

关键词: 准分子激光角膜切削术; 角膜上皮雾状混浊 (haze); 雷帕霉素; 自噬

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.3.03

## Effects of Rapamycin on corneal haze after photorefractive keratectomy in rabbits

Rui Yu, Hong-Lian Gao, Xin-Meng Li, Qi-Qi Liu, Lei Zhang

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Correspondence to: Lei Zhang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong Province, China. [zhangleisd@263.net](mailto:zhangleisd@263.net)

Received: 2021-01-14 Accepted: 2022-02-09

## Abstract

• AIM: To investigate the effect of modulated autophagy activity on subepithelial haze after photorefractive keratectomy (PRK) in rabbits.

• METHODS: Totally 64 New Zealand white rabbits were randomly divided into 4 groups according to different postoperative medication after PRK operation, including simple PRK group, 14 $\mu$ mol/L DMSO group, 50 $\mu$ mol/L rapamycin group and 100 $\mu$ mol/L rapamycin group. According to the group situation, two hours after the operation, eye drops were given, 3 times a day for 7d. Another 16 rabbits were selected as normal control group. The postoperative inflammatory response and corneal epithelial healing were observed with slit-lamp microscope every day. Haze formation of each group at 1 and 4wk after PRK was collected by slit-lamp microscopy system. Eight rabbits in each group were killed by air embolization 1 and 4wk after PRK, and corneal tissue was extracted and frozen for later use. Immunohistochemistry was used to detect the expression levels of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). Real-time PCR was used to detect the relative expression levels of autophagy-5 (ATG5), autophagy-12 (ATG12), B lymphocytoma gene-2 (Bcl-2) and cysteine aspartic proteinase-3 (Caspase3) genes.

• RESULTS: Corneal epithelium of all operative rabbits healed completely at 3-4d and no significant difference in

healing time between the groups after operation ( $F = 0.745, P = 0.530$ ). During the observation period, haze was the most obvious at 4wk after operation in all groups. The haze symptoms were more serious in the simple operation group and the 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO group, followed by the 50 $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group. The haze symptoms in the 100 $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group were significantly relieved than those in other groups. There was no significant difference in the haze grading with different time points after operation among all groups (all  $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry showed that the expression of TGF- $\beta$ 1, MMP-2 and  $\alpha$ -SMA was stronger in the operation group and 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO group, followed by 50 $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group, and weakest in 100 $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group than other groups at 1 and 4wk after operation (all  $P < 0.05$ ). The results of PCR showed that the relative expression of ATG5, ATG12 and Bcl-2 mRNA in 50 $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group and 100 $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group were significantly higher than those in simple operation group and 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO group at 1 and 4wk after operation (all  $P < 0.05$ ); The relative expression of Caspase3 mRNA in 50 $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group and 100 $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group was significantly lower than that in simple operation group and 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO group (all  $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Rapamycin can enhance autophagy level and inhibit apoptosis level, thus reducing haze formation after PRK in rabbits.

• **KEYWORDS:** photorefractive keratectomy; haze; Rapamycin; autophagy

**Citation:** Yu R, Gao HL, Li XM, *et al.* Effects of Rapamycin on corneal haze after photorefractive keratectomy in rabbits. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(3):366-372

## 0 引言

在过去的 30a 里,近视的发病率显著增加,预计到 2050 年,全球将有一半的人口发展为近视<sup>[1]</sup>。屈光手术有着很大的临床需求,而准分子激光角膜切削术(photorefractive keratectomy, PRK)经过不断地改良和完善,以其安全高效、术后角膜生物力学稳定和无角膜瓣并发症风险等优势目前仍在广泛应用<sup>[2-4]</sup>。角膜上皮下雾状混浊(haze)是 PRK 术后最常见的并发症,会引起屈光回退、眩光和对对比敏感度下降等问题。目前临床中常用于控制 haze 的药物包括糖皮质激素、抗代谢药物、非甾体类抗炎药等,上述药物主要通过抗炎与抗凋亡途径来抑制 haze,但存在继发激素性高眼压、浅层点状角膜炎和角膜内皮毒性损害等不良反应的可能<sup>[5]</sup>。haze 是由于基质重建过程中胶原纤维生成与降解的失衡,引起胶原纤维排列紊乱导致的,目前有研究表明调节自噬活性可以抑制组织的纤维化程度<sup>[6-8]</sup>。雷帕霉素(rapamycin)属于大环内酯类抗生素,也是一种自噬激活剂,有研究发现雷帕霉素可以抑制 mTOR 通路,增强细胞自噬活性,进而抑制肾脏、心肌等组织纤维化程度<sup>[9-12]</sup>。本研究拟通过建立兔眼 PRK 手术模型,术后给予雷帕霉素滴眼液治疗,观察其对角膜

haze 形成的影响,并初步分析自噬因子及相关凋亡基因的表达情况。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验动物:健康普通级新西兰大白兔 80 只,雌雄不限,体质量 2.0~2.5kg,购于济南西岭角养殖繁育中心,入组前筛查排除无眼部疾病。实验动物的饲养和使用遵循滨州医学院动物管理委员会相关规定。本研究方案经滨州医学院附属医院伦理委员会审批。主要试剂:DMSO(北京索莱宝生物科技有限公司);雷帕霉素(MedChemExpress 公司);小鼠增强聚合酶法检测系统(北京中杉金桥生物科技有限公司);鼠源性转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)抗体(英国 Abcam 公司);DAB 显色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);动物组织总 RNA 提取试剂盒(天根生物科技有限公司);反转录试剂盒,荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Roche 公司)。主要仪器:准分子激光仪 VISX STAR S4(美国 AMO 公司);裂隙灯显微镜(瑞士 Haag-Streit 公司, BQ-900)。

## 1.2 方法

**1.2.1 兔 PRK 模型的制作和分组** 将 80 只新西兰大白兔采用随机数字表法分为正常对照组、单纯手术组、14 $\mu\text{mol/L}$  二甲基亚砷(DMSO)组、50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组和 100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组,各 16 只,均取右眼为实验眼。单纯手术组、14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO 组、50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组和 100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组术前 3d 给予质量分数 0.3% 氧氟沙星眼膏点眼预防感染,术前耳缘静脉注射质量分数 3% 戊巴比妥钠(30mg/kg)进行全身麻醉,质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液行眼表麻醉,准分子激光系统下行 PRK 手术;激光参数:准分子激光治疗性角膜切削术(phototherapeutic keratectomy, PTK)模式去除角膜上皮,能量设置 160mJ/cm<sup>2</sup>,切削深度 120 $\mu\text{m}$ ,光学区切削直径 6.0mm。术后平衡盐水冲洗,配戴软性角膜接触镜,术后每天 3 次质量分数 0.3% 氧氟沙星眼膏涂眼,预防感染。

**1.2.2 雷帕霉素滴眼液的配制及给药方式** DMSO 助溶雷帕霉素,配制为 100mmol/L 的雷帕霉素母液,无菌操作下用生理盐水稀释为 50 $\mu\text{mol/L}$  和 100 $\mu\text{mol/L}$  的雷帕霉素滴眼液, DMSO 终浓度为 0.1%。14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO 组、50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组和 100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组分别应用 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO、50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素和 100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素点眼,每天 3 次,每次 1 滴,连续给药 7d,单纯手术组只行 PRK 手术,正常对照组不做任何处理。

**1.2.3 术后角膜上皮愈合时间及 haze 分级** 术后每日观察实验眼有无感染发生以及角膜上皮的愈合情况,记录并进行比较。术后 1、4wk 进行 haze 分级。采用 Fantes 的分级标准:角膜透明为 0 级;裂隙灯下仔细观察可见角膜细微混浊为 1 级;易观察到轻度混浊为 2 级;中度混浊,影响观察虹膜结构为 3 级;重度混浊,遮挡眼内结构为 4 级<sup>[13]</sup>。

**1.2.4 标本采集及石蜡切片制作** 术后 1、4wk 各组分别任意选取 8 只新西兰大白兔,采用空气栓塞法处死,处死后迅速取实验眼角膜,其中 4 只角膜放入质量分数 4% 多聚甲醛中固定,经脱水、透明和石蜡包埋后,制成 4 $\mu\text{m}$  石蜡切片;另外 4 只放入 -80 $^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存进行 PCR。

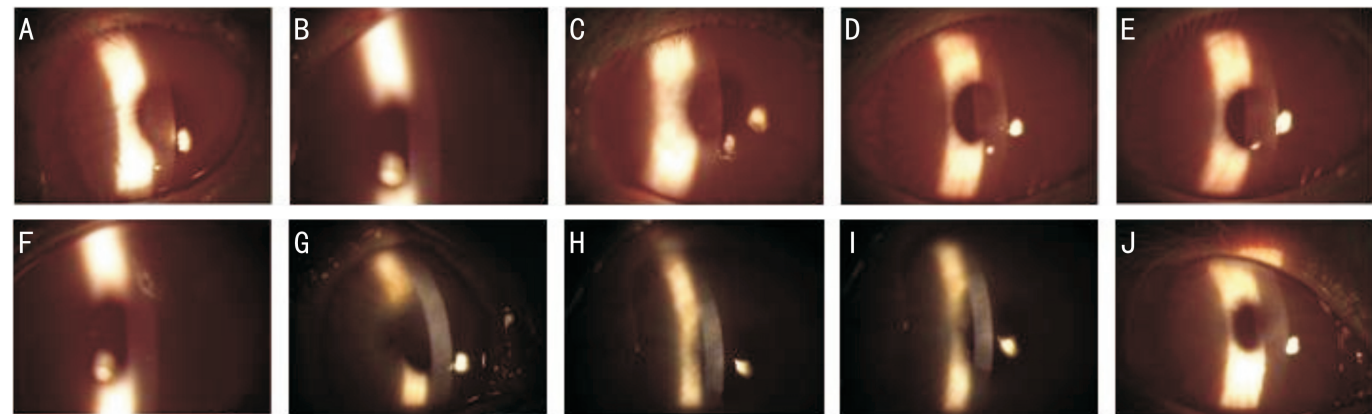


图1 裂隙灯显微镜观察各组兔眼不同时间点 haze 情况 A:1wk 后正常对照组;B:术后 1wk 单纯手术组;C:术后 1wk 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO 组;D:术后 1wk 50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组;E:术后 1wk 100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组;F:4wk 后正常对照组;G:术后 4wk 单纯手术组;H:术后 4wk 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO 组;I:术后 4wk 50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组;J:术后 4wk 100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组。

表1 引物序列

基因	上游引物	下游引物
ATG5	5'-GCTGCATACACTTGGCGATCT-3'	5'-ATGCTCACTCAGCCACTGGA-3'
ATG12	5'-GGACTTTGCGCGGAGGAATC-3'	5'-CTCCTGAGCCCGTGAATCT-3'
Bcl-2	5'-GGTCCGTGTCATTCCTCCATA-3'	5'-GCCTTTGAGTGTGCCAGTATC-3'
Caspase3	5'-AGCCACGGTGATGAAGGAGTC-3'	5'-GCCTCGGCAAGCCTGAATAATG-3'
GAPDH	5'-CAAGTGGGGTGATGCTGCT-3'	5'-TTTTGGCTCCGCCCTTC-3'

注:ATG5:自噬因子-5;ATG12:自噬因子-12;Bcl-2:B 淋巴细胞瘤基因-2;Caspase3:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3。

**1.2.5 免疫组化检测  $\alpha$ -SMA 和 TGF- $\beta$ 1 及 MMP-2 的表达** 石蜡切片烤片,脱蜡,高压抗原修复,封闭液封闭 30min,一抗分别滴加小鼠抗兔  $\alpha$ -SMA(1:100)、TGF- $\beta$ 1(1:50)、MMP-2(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,滴加反应增强液,滴加增强酶标山羊抗小鼠 IgG 聚合物,DAB 显色(出现棕黄色即为阳性),苏木素复染 1min,经脱水、透明后用中性树脂封片,光学显微镜下观察并拍照。光学显微镜下观察各标本,400 倍镜下每张切片任意选取 3 个视野,通过 Image Pro Plus 6.0 图像处理分析软件分析各组染色区的吸光度(A)值。

**1.2.6 Real Time PCR 法检测 ATG5 和 ATG12 与 Bcl-2 及 Caspase3 的 mRNA 表达水平** 将角膜置于冰上研磨,用动物组织总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,紫外分光光度计测定提取 RNA 的浓度;根据 NCBI 提供的基因序列,由 Takara 合成引物序列(表 1)。用反转录试剂盒进行反转录,合成 cDNA;以 GAPDH 为内参。按 2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix 说明书设置 PCR 反应条件,记录 CT 值,使用 2 $^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法进行分析。

统计学分析:采用统计学软件 SPSS22.0 进行分析。所有数据经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,经 Levene 检验符合方差齐性,均以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较应用单因素方差分析,进一步两两比较应用 LSD- $t$  检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 各组兔眼术后角膜上皮愈合时间的比较** 术后每天手持裂隙灯观察兔角膜愈合情况,各组角膜上皮均在术后 3~4d 内愈合。单纯手术组、14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO 组、50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组和 100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组术后角膜上皮愈合时间分别为 3.44 $\pm$ 0.51、3.50 $\pm$ 0.52、3.38 $\pm$ 0.50、

表2 PRK 术后不同时间点各组 haze 分级比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,级)

组别	术后 1wk	术后 4wk
单纯手术组	1.47 $\pm$ 0.56	2.31 $\pm$ 0.60
14 $\mu\text{mol/L}$ DMSO 组	1.53 $\pm$ 0.56	2.19 $\pm$ 0.66
50 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素组	1.09 $\pm$ 0.49 <sup>a,c</sup>	1.56 $\pm$ 0.51 <sup>a,c</sup>
100 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素组	0.72 $\pm$ 0.26 <sup>a,c,e</sup>	1.16 $\pm$ 0.44 <sup>a,c,e</sup>
<i>F</i>	9.667	15.142
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 单纯手术组;<sup>c</sup> $P<0.05$  vs 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO 组;<sup>e</sup> $P<0.05$  vs 50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组。

3.25 $\pm$ 0.45d,各组兔眼术后角膜上皮愈合时间比较,差异无统计学意义( $F=0.745$ , $P=0.530$ )。

**2.2 各组兔眼术后 haze 分级比较** 正常对照组无 haze 形成。单纯手术组、14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO 组、50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组和 100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组均在术后 1wk 出现不同程度 haze,术后 4wk 时 haze 症状最重。术后 1、4wk,单纯手术组和 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO 组 haze 症状均较严重,其次为 50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组,100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组 haze 症状较其他组明显减轻(图 1)。各组不同时间点 haze 分级的比较,差异均有统计学意义( $P<0.01$ ),其中 50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组和 100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组 haze 分级较单纯手术组和 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO 组明显降低,100 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组 haze 分级较 50 $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组明显降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );单纯手术组和 14 $\mu\text{mol/L}$  DMSO 组 haze 分级比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 2。

**2.3 各组兔角膜 TGF- $\beta$ 1 和 MMP-2 及  $\alpha$ -SMA 的表达** 正常对照组角膜中表达微量 MMP-2,无  $\alpha$ -SMA 和 TGF- $\beta$ 1 表达。PRK 术后 1wk,各组均出现 TGF- $\beta$ 1、



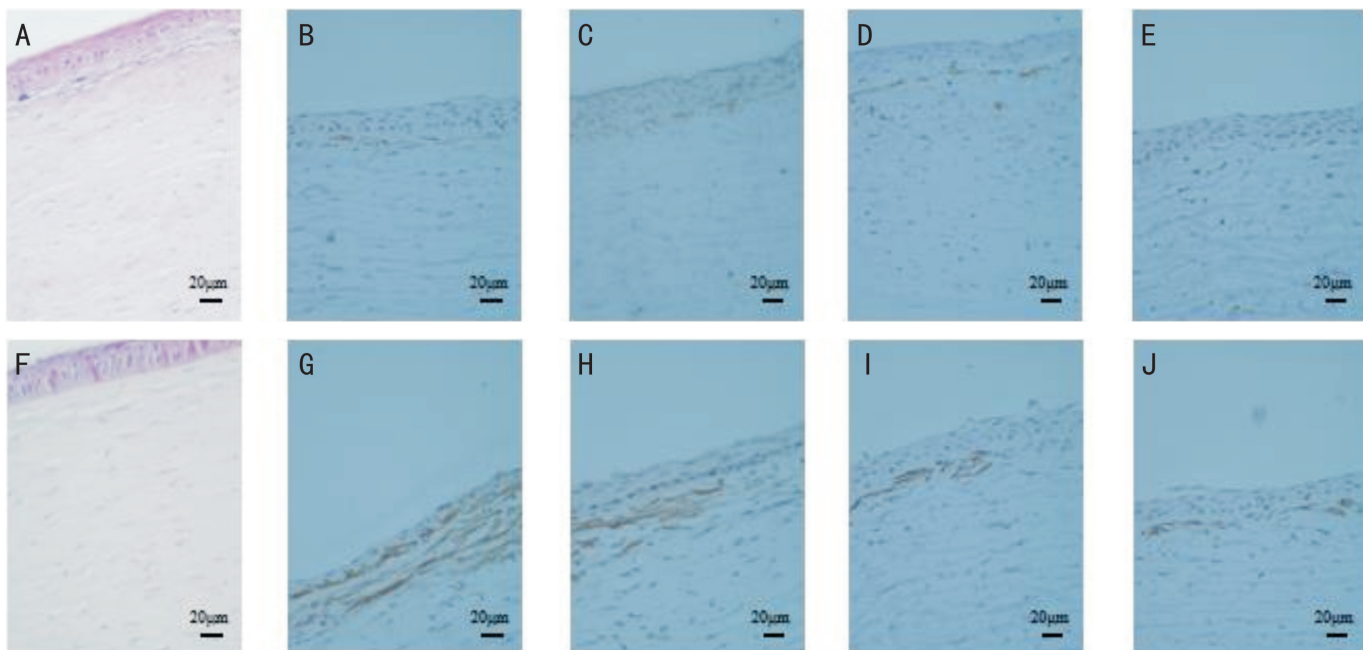


图2 免疫组织化学法检测角膜中 TGF- $\beta$ 1 情况 (DAB) A:1wk 后正常对照组;B:术后 1wk 单纯手术组;C:术后 1wk 14 $\mu$ mol/L DMSO 组;D:术后 1wk 50 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组;E:术后 1wk 100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组;F:4wk 后正常对照组;G:术后 4wk 单纯手术组;H:术后 4wk 14 $\mu$ mol/L DMSO 组;I:术后 4wk 50 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组;J:术后 4wk 100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组。

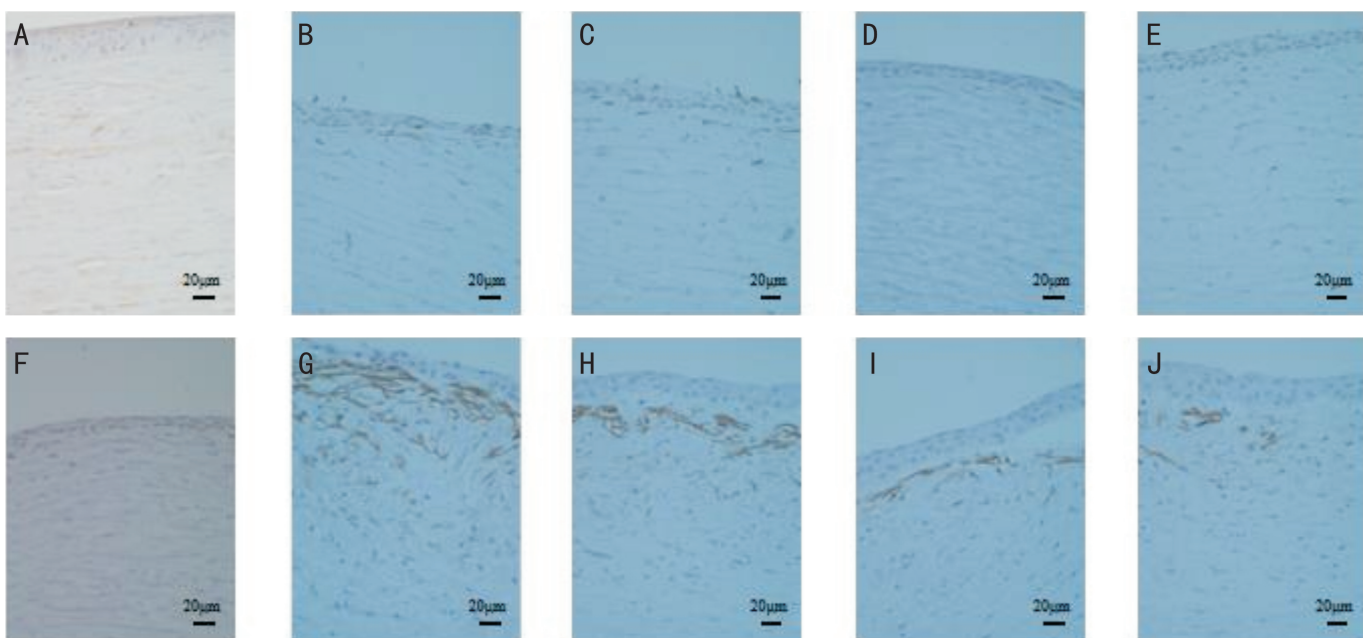


图3 免疫组织化学法检测角膜中 MMP-2 情况 (DAB) A:1wk 后正常对照组;B:术后 1wk 单纯手术组;C:术后 1wk 14 $\mu$ mol/L DMSO 组;D:术后 1wk 50 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组;E:术后 1wk 100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组;F:4wk 后正常对照组;G:术后 4wk 单纯手术组;H:术后 4wk 14 $\mu$ mol/L DMSO 组;I:术后 4wk 50 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组;J:术后 4wk 100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组。

MMP-2、 $\alpha$ -SMA 表达,在 50、100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组中表达呈弱阳性,在单纯手术组和 14 $\mu$ mol/L DMSO 组中呈中等阳性;PRK 术后 4wk,各组 TGF- $\beta$ 1、MMP-2、 $\alpha$ -SMA 表达均增强(图 2~4)。各组兔眼不同时间点 TGF- $\beta$ 1、MMP-2、 $\alpha$ -SMA 3 种因子平均 A 值比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),其中术后各时间点 50、100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组 TGF- $\beta$ 1、MMP-2、 $\alpha$ -SMA 3 种因子平均 A 值均较单纯手术组和 14 $\mu$ mol/L DMSO 组明显降低;100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组 TGF- $\beta$ 1、MMP-2、 $\alpha$ -SMA 3 种因子平均 A 值较 50 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组明显降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );单纯手术组、14 $\mu$ mol/L DMSO 组、50 $\mu$ mol/L 雷

帕霉素组和 100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组 MMP-2 因子平均 A 值较正常对照组升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );单纯手术组和 14 $\mu$ mol/L DMSO 组 TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA 平均 A 值比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3、4。

**2.4 RT-PCR 检测结果** 各组不同时间点 ATG5、ATG12、Bcl-2 和 Caspase3 mRNA 相对表达量的比较,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),其中单纯手术组、14 $\mu$ mol/L DMSO 组、50 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组和 100 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组 ATG5、ATG12、Caspase3 mRNA 相对表达量较正常对照组升高,Bcl-2 mRNA 相对表达量较正常对照组降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );50 $\mu$ mol/L 雷帕霉素组和

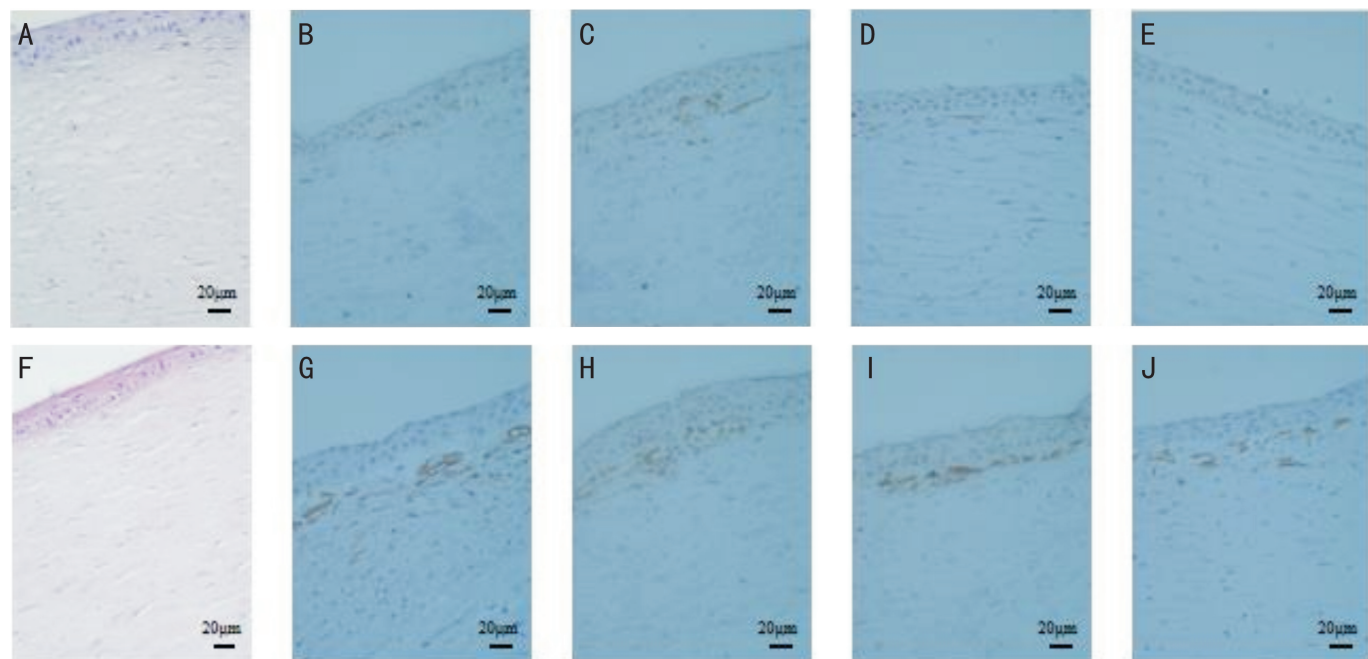


图4 免疫组织化学法检测角膜中 $\alpha$ -SMA情况(DAB) A:1wk后正常对照组;B:术后1wk单纯手术组;C:术后1wk 14 $\mu$ mol/L DMSO组;D:术后1wk 50 $\mu$ mol/L雷帕霉素组;E:术后1wk 100 $\mu$ mol/L雷帕霉素组;F:4wk后正常对照组;G:术后4wk单纯手术组;H:术后4wk 14 $\mu$ mol/L DMSO组;I:术后4wk 50 $\mu$ mol/L雷帕霉素组;J:术后4wk 100 $\mu$ mol/L雷帕霉素组。

表3 各组兔眼术后不同时间点角膜中TGF- $\beta$ 1和 $\alpha$ -SMA表达的比较

组别	TGF- $\beta$ 1		$\alpha$ -SMA	
	术后1wk	术后4wk	术后1wk	术后4wk
单纯手术组	0.121 $\pm$ 0.003	0.165 $\pm$ 0.002	0.121 $\pm$ 0.001	0.166 $\pm$ 0.001
14 $\mu$ mol/L DMSO组	0.122 $\pm$ 0.004	0.164 $\pm$ 0.002	0.123 $\pm$ 0.002	0.167 $\pm$ 0.003
50 $\mu$ mol/L雷帕霉素组	0.079 $\pm$ 0.002 <sup>a,c</sup>	0.130 $\pm$ 0.003 <sup>a,c</sup>	0.081 $\pm$ 0.002 <sup>a,c</sup>	0.132 $\pm$ 0.001 <sup>a,c</sup>
100 $\mu$ mol/L雷帕霉素组	0.040 $\pm$ 0.001 <sup>a,c,e</sup>	0.082 $\pm$ 0.002 <sup>a,c,e</sup>	0.041 $\pm$ 0.001 <sup>a,c,e</sup>	0.082 $\pm$ 0.001 <sup>a,c,e</sup>
<i>F</i>	1367.389	1387.188	2394.295	5423.772
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 单纯手术组;<sup>c</sup>*P*<0.05 vs 14 $\mu$ mol/L DMSO组;<sup>e</sup>*P*<0.05 vs 50 $\mu$ mol/L雷帕霉素组。

表4 各组兔眼术后不同时间点角膜中MMP-2表达的比较

组别	$\bar{x} \pm s$	
	术后1wk	术后4wk
正常对照组	0.041 $\pm$ 0.001	0.051 $\pm$ 0.002
单纯手术组	0.124 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.164 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>
14 $\mu$ mol/L DMSO组	0.126 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.162 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>
50 $\mu$ mol/L雷帕霉素组	0.083 $\pm$ 0.014 <sup>a,c,e</sup>	0.132 $\pm$ 0.002 <sup>a,c,e</sup>
100 $\mu$ mol/L雷帕霉素组	0.051 $\pm$ 0.036 <sup>a,c,e,g</sup>	0.090 $\pm$ 0.002 <sup>a,c,e,g</sup>
<i>F</i>	2631.940	3468.087
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 正常对照组;<sup>c</sup>*P*<0.05 vs 单纯手术组;<sup>e</sup>*P*<0.05 vs 14 $\mu$ mol/L DMSO组;<sup>g</sup>*P*<0.05 vs 50 $\mu$ mol/L雷帕霉素组。

100 $\mu$ mol/L雷帕霉素组ATG5、ATG12、Bcl-2 mRNA相对表达量较单纯手术组和14 $\mu$ mol/L DMSO组明显升高,Caspase3 mRNA相对表达量较单纯手术组和14 $\mu$ mol/L DMSO组明显降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);100 $\mu$ mol/L雷帕霉素组ATG5、ATG12、Bcl-2 mRNA相对表达量较50 $\mu$ mol/L雷帕霉素组明显升高,Caspase3 mRNA相对表达量较50 $\mu$ mol/L雷帕霉素组明显降低,差

异均有统计学意义(*P*<0.05);单纯手术组和14 $\mu$ mol/L DMSO组ATG5、ATG12、Bcl-2和Caspase3 mRNA相对表达量比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表5。

### 3 讨论

PRK后haze形成的过程就是一个角膜创伤过度愈合的过程,这一过程开始于角膜坏死细胞的清除<sup>[14-15]</sup>。基质损伤后,细胞因子的释放诱导角膜基质细胞发生凋亡,并刺激邻近细胞增殖和迁移<sup>[16]</sup>。角膜基质细胞在TGF- $\beta$ 1等因子作用下转化为角膜成纤维细胞,分化为角膜肌成纤维细胞,TGF- $\beta$ 1是调控分化的关键因子。肌成纤维细胞可特征性地表达 $\alpha$ -SMA,导致胶原纤维排列紊乱。MMPs是IV型胶原蛋白水解酶,能降解基质中的主要骨架。重建基质过程中产生的细胞外基质(ECM)可以促进肌成纤维细胞的生成,产生粗大胶原纤维,这种降解与生成的失衡导致胶原纤维排列紊乱,从而形成了haze<sup>[4,17]</sup>。Milani等<sup>[18]</sup>研究表明应用雷帕霉素后可以抑制 $\alpha$ -SMA和TGF- $\beta$ 1的表达;在本研究中发现,PRK术后每日裂隙灯显微镜下观察50 $\mu$ mol/L雷帕霉素组和100 $\mu$ mol/L雷帕霉素组haze严重程度较其他手术组明显减轻,术后1、4wk TGF- $\beta$ 1、MMP-2、 $\alpha$ -SMA的表达与各组haze严重程度相同,说明术后应用雷帕霉素可以减轻

表5 各组不同时间点 ATG5、ATG12、Bcl-2、Caspase3 mRNA 相对表达量

$\bar{x} \pm s$

组别	ATG5		ATG12	
	术后 1wk	术后 4wk	术后 1wk	术后 4wk
正常对照组	1.00±0.07	1.00±0.01	1.00±0.12	1.00±0.04
单纯手术组	1.30±0.13 <sup>a</sup>	1.51±0.01 <sup>a</sup>	1.23±0.03 <sup>a</sup>	1.55±0.01 <sup>a</sup>
14μmol/L DMSO 组	1.40±0.08 <sup>a</sup>	1.54±0.01 <sup>a</sup>	1.21±0.07 <sup>a</sup>	1.54±0.01 <sup>a</sup>
50μmol/L 雷帕霉素组	1.55±0.03 <sup>a,c,e</sup>	1.82±0.02 <sup>a,c,e</sup>	1.60±0.02 <sup>a,c,e</sup>	1.86±0.04 <sup>a,c,e</sup>
100μmol/L 雷帕霉素组	1.86±0.05 <sup>a,c,e,g</sup>	2.10±0.04 <sup>a,c,e,g</sup>	1.74±0.13 <sup>a,c,e,g</sup>	2.22±0.06 <sup>a,c,e,g</sup>
F	45.985	1153.265	34.639	414.765
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

组别	Bcl-2		Caspase3	
	术后 1wk	术后 4wk	术后 1wk	术后 4wk
正常对照组	1.00±0.04	1.00±0.05	1.00±0.09	1.00±0.05
单纯手术组	0.32±0.00 <sup>a</sup>	0.61±0.03 <sup>a</sup>	1.70±0.01 <sup>a</sup>	1.41±0.01 <sup>a</sup>
14μmol/L DMSO 组	0.31±0.00 <sup>a</sup>	0.62±0.02 <sup>a</sup>	1.71±0.01 <sup>a</sup>	1.42±0.01 <sup>a</sup>
50μmol/L 雷帕霉素组	0.39±0.02 <sup>a,c,e</sup>	0.73±0.02 <sup>a,c,e</sup>	1.62±0.02 <sup>a,c,e</sup>	1.29±0.01 <sup>a,c,e</sup>
100μmol/L 雷帕霉素组	0.46±0.02 <sup>a,c,e,g</sup>	0.90±0.06 <sup>a,c,e,g</sup>	1.48±0.02 <sup>a,c,e,g</sup>	1.14±0.01 <sup>a,c,e,g</sup>
F	633.930	53.879	150.279	168.788
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup>P<0.05 vs 正常对照组;<sup>c</sup>P<0.05 vs 单纯手术组;<sup>e</sup>P<0.05 vs 14μmol/L DMSO 组;<sup>g</sup>P<0.05 vs 50μmol/L 雷帕霉素组。

TGF-β1、MMP-2、α-SMA 的表达,抑制 haze 的形成。

自噬 (autophagy) 是一种通过溶酶体对细胞质蛋白和细胞器进行精心安排、自我调节的细胞内降解机制,既往许多研究表明自噬对细胞的正常稳态和健康功能至关重要<sup>[19]</sup>。自噬是由两大类信号分子调控,包括 mTOR 依赖通路和非 mTOR 依赖通路,其中前者是主要通路。mTOR 是高度保守的 Ser/Thr 蛋白激酶复合物,调控细胞生长、存活和代谢。此外,mTOR 可以促进蛋白质合成<sup>[20]</sup>,抑制蛋白质分解代谢,并通过调节自噬和凋亡水平<sup>[21]</sup>来促进细胞生长发育过程。参与自噬的基因被称为自噬相关基因(ATGs),目前已鉴定出 12 个 ATGs,ATGs 的表达水平可以反映自噬的活性,并通过 ATG12~ATG5 和 ATG8(LC3)-PE(磷脂酰乙醇胺)系统<sup>[22]</sup>调控自噬体的形成。雷帕霉素可以与 mTOR 受体结合,抑制 mTOR 发挥作用,是一种典型的 mTOR 通路抑制剂,也是自噬激活剂。Lin 等<sup>[23]</sup>研究表明应用雷帕霉素后可以通过诱导自噬去降低纤维化水平;在本研究中发现,50μmol/L 雷帕霉素组和 100μmol/L 雷帕霉素组的 ATG5 和 ATG12 mRNA 相对表达量较单纯手术组和 14μmol/L DMSO 组明显上调,提示自噬增强,且角膜纤维化程度较单纯手术组和 14μmol/L DMSO 组明显减轻。细胞凋亡是程序性的细胞死亡,是消除功能失调或受损细胞的生理过程<sup>[24]</sup>。Caspase 家族是调节细胞凋亡的关键因子,它的级联激活诱导细胞凋亡,而 Bcl-2 调控 Caspase 的激活。Lin 等<sup>[23]</sup>研究表明应用雷帕霉素后可以降低细胞凋亡水平;在本研究中发现,50、100μmol/L 雷帕霉素组的 Bcl-2 mRNA 的相对表达量较单纯手术组和 14μmol/L DMSO 组明显上调,Caspase3 mRNA 的相对表达量较单纯手术组和 14μmol/L DMSO 组明显下调,提示凋亡水平受到抑制,且角膜纤维化程度较单纯手术组和 14μmol/L DMSO 组明显减轻。在本研究结果中发现 100μmol/L 雷帕霉素组自噬活性高于 50μmol/L 雷帕霉素组,且对 haze 的抑制程度最强,提示雷帕霉素对

PRK 术后 haze 的抑制程度可能存在浓度依赖性。

正常情况下角膜组织中的细胞自噬和凋亡水平处于动态平衡的状态,当受到创伤或感染时,不同信号调节通路可能通过激活或抑制自噬来维持细胞内环境的稳定<sup>[25]</sup>。本研究结果显示,兔眼 PRK 术后应用雷帕霉素,自噬水平增加,凋亡水平受到抑制,haze 形成也受到抑制,提示雷帕霉素可能通过调节自噬活性来抑制 haze 的形成。但是,雷帕霉素的给药浓度界限需要进一步的实验进行明确,我们会在接下来的实验中进行进一步研究。

参考文献

- Jonas JB, Panda-Jonas S. Epidemiologie und anatomie der Myopie. *Der Ophthalmol* 2019;116(6):499-508
- Adib - Moghaddam S, Soleyman - Jahi S, Moghaddam AS, et al. Efficacy and safety of transepithelial photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2018;44(10):1267-1279
- Spadea L, Giovannetti F. Main complications of photorefractive keratectomy and their management. *Clin Ophthalmol* 2019; 13: 2305-2315
- Doroodgar F, Sedaghat M, Niazi S, et al. LASIK, SMILE and PRK: advantages and indication. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(10):1643-1651
- Tomás-Juan J, Murueta-Goyena Larrañaga A, Hanneken L. Corneal regeneration after photorefractive keratectomy: a review. *J Optom* 2015;8(3):149-169
- Li Y, Song B, Ruan CC, et al. AdipoRon attenuates hypertension-induced epithelial - mesenchymal transition and renal fibrosis via promoting epithelial autophagy. *J Cardiovasc Transl Res* 2021; 14(3): 538-545
- Ma ZC, Qi J, Gao L, et al. Role of exercise on alleviating pressure overload-induced left ventricular dysfunction and remodeling via AMPK-dependent autophagy activation. *Int Heart J* 2020;61(5):1022-1033
- Chen G, Jin X, Luo DY, et al. B-Adrenoceptor regulates contraction and inflammatory cytokine expression of human bladder smooth muscle cells via autophagy under pathological hydrostatic pressure. *NeuroUrol Urodyn* 2020;39(8):2128-2138



9 Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int* 2001;59(1):3-16

10 Zhang C, Chan CCY, Cheung KF, et al. Effect of mycophenolate and rapamycin on renal fibrosis in lupus nephritis. *Clin Sci (Lond)* 2019;133(15):1721-1744

11 Tang CY, Livingston MJ, Liu ZW, et al. Autophagy in kidney homeostasis and disease. *Nat Rev Nephrol* 2020;16(9):489-508

12 Wang B, Ding W, Zhang MM, et al. Rapamycin attenuates aldosterone-induced tubulointerstitial inflammation and fibrosis. *Cell Physiol Biochem* 2015;35(1):116-125

13 Torricelli AAM, Santhanam A, Wu JH, et al. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Exp Eye Res* 2016;142:110-118

14 夏世刚,王俞方,肖启国,等.羊膜提取液抑制兔Epi-LASIK术后haze形成的作用和机制. *国际眼科杂志* 2017;17(8):1427-1432

15 Meduri A, Aragona P, Grenga PL, et al. Effect of basic fibroblast growth factor on corneal epithelial healing after photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2012;28(3):220-223

16 Chaurasia S, Kaur H, Medeiros F, et al. Reprint of "Dynamics of the expression of intermediate filaments vimentin and desmin during myofibroblast differentiation after corneal injury". *Exp Eye Res* 2009;89(4):590-596

17 Margo JA, Munir WM. Corneal haze following refractive surgery: a review of pathophysiology, incidence, prevention, and treatment. *Int*

*Ophthalmol Clin* 2016;56(2):111-125

18 Milani BY, Milani FY, Park DW, et al. Rapamycin inhibits the production of myofibroblasts and reduces corneal scarring after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(12):7424-7430

19 许君彧, 张晓梅. 线粒体自噬在眼科相关疾病中的研究进展. *国际眼科杂志* 2018;18(3):478-481

20 Jin J, Hu K, Ye MY, et al. Rapamycin reduces podocyte apoptosis and is involved in autophagy and mTOR/P70S6K/4EBP<sub>1</sub> signaling. *Cell Physiol Biochem* 2018;48(2):765-772

21 Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149(2):274-293

22 Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 2015;125(1):25-32

23 Lin H, Wang T, Ruan YJ, et al. Rapamycin supplementation may ameliorate erectile function in rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes by inducing autophagy and inhibiting apoptosis, endothelial dysfunction, and corporal fibrosis. *J Sex Med* 2018;15(9):1246-1259

24 Yin ZY, Yin J, Huo YF, et al. Rapamycin facilitates fracture healing through inducing cell autophagy and suppressing cell apoptosis in bone tissues. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(21):4989-4998

25 Martin LM, Jeyabalan N, Tripathi R, et al. Autophagy in corneal health and disease: a concise review. *Ocular Surf* 2019;17(2):186-197