doi:10.11659/jjssx.06E016008

bFGF 改善白内障手术引发角膜内皮损伤

孙丹宇,包 赫,姜仕先 (哈尔滨二四二医院眼二科,黑龙江 哈尔滨 150066)

[摘 要] **目的** 探究碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对白内障手术引发角膜内皮损伤修复的作用。**方法** 采用超声乳化摘除 30 只兔子(60 眼)的晶体,将其分为 2 组,随机分为 bFGF 治疗组和对照组。bFGF 治疗组滴用 bFGF 眼用凝胶,对照组滴用相同体积的生理盐水,分别每天滴用 3 次。观察记录 2 组眼睛消肿的时间;在手术后不同时间,分别检测 2 组切口的愈合面积、角膜厚度、角膜内皮细胞密度,分别取各组前房水,检测各组前房水中 NO、IL-1、IL-6 和 TNF-α 的含量。**结果** bFGF 治疗组的眼睛消肿时间较对照组显著减少($P<0.05$);bFGF 治疗加速了切口愈合速率、角膜厚度和角膜内皮细胞密度的恢复及前房水内 NO、IL-1、IL-6 和 TNF-α 的减少。**结论** bFGF 可改善白内障手术引起的角膜内皮细胞损伤。

[关键词] 白内障手术;碱性成纤维细胞生长因子;角膜内皮损伤;角膜内皮细胞密度
[中图分类号] R776.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-06-06

Effect of basic fibroblast growth factor on corneal endothelial cell damage after cataract surgery

SUN Dan-yu, Bao He, JIANG Shi-xian (Department of Ophthalmology, Two Four Two Hospital of Haerbin, Haerbin Heilongjiang 150066, China)

Abstract: Objective To explore the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on corneal endothelial cell damage after cataract surgery. **Methods** Thirty rabbits (60 eyes) whose lens extraction were done by phacoemulsification were divided into 2 groups, namely, bFGF treatment group and control group. bFGF ophthalmic gel was used to treat the eyes 3 times daily in bFGF treatment group, and the saline of the same volume was treated to the eyes in control group. The time of corneal edema subsidence was recorded; the healing area of incision, corneal thickness, the density of corneal endothelial cells and the NO, IL-1, IL-6 andTNF-α contents of the aqueous sample in anterior chamber were measured. **Results** The time of corneal edema subsidence of bFGF treatment group decreased significantly compared with control group; bFGF treatment accelerated the healing rate of incision, the recovery of corneal thickness and the density of corneal endothelial cells and the decrease of the NO, IL-1 IL-6 and TNF-α contents of the aqueous sample in anterior chamber. **Conclusion** bFGF treatment can accelerate the recovery of the corneal endothelial cell damage, which was induced by cataract surgery.

Keywords: cataract surgery; basic fibroblast growth factor; endothelial cell damage; the density of corneal endothelial cells

白内障是眼科最常见的致盲性眼病,目前临床治疗白内障的主要手段是采用小切口白内障囊外摘除术和超声乳化手术。其中,超声乳化手术因反应轻、切口小、术后恢复快已被公认为最先进、成熟的手术方式。但是超声乳化手术也存在角膜内皮细胞的损伤缺点。超声乳化术对六角形细胞比例、角膜内皮细胞密度、数目及面积均有较为显著的影响,可引起角膜内皮细胞丢失,使角膜内皮细胞产生不同程度的损伤,进一步引起角膜混浊或角膜内皮失代偿,严重时甚至可以引发角膜内出现大泡性角膜病变,严重影响术后视力的改善[1-3]。角膜的光学性和高度透明是视觉器官发挥正常生理功能的必要条件。健康且足够数量的角膜内皮细胞则是维持角膜半脱水状态、正常厚度和透明性的先决条件[4-6]。大量研究表明,当角膜内皮细胞受到破坏后,邻近角膜细胞可以通过扩大移行来修补缺损区,但是这种代偿修补能力是有限的,当角膜内皮细胞发生严重损伤,导致其细胞密度降到健康时的 25% ~45%、六角形细胞的数目少于健康时的 30% ~40%、单个细胞面积相比于健康时增加 3 ~4 倍时,可引起很多角膜病理变化的发生,如角膜透明度下降、内眼手术的机械创伤致角膜基质水肿以及前房的炎症反应,严重时甚至可以引起大疱性角膜病变[6-8]。有研究证明,bFGF 具有促进角膜内皮细胞增殖以及修复角膜基质细胞的功能[6,9-10],但是关于 bFGF 与对白内障手术引发角膜内皮损伤之间的关系的研究尚未见报道。本研究探析了 bFGF 对白内障手术引发角膜内皮损伤的修复功能,为其治疗提供理论基础。

[基金项目] 黑龙江省卫生厅 2014 年科学研究专项项目(2014075)

1 材料与方法

1.1 实验动物

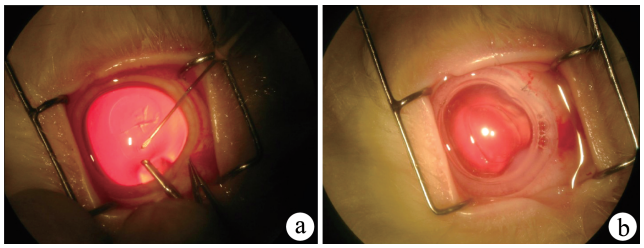
清洁级新西兰白兔30只(60眼),雌雄各半,体质量2.5~3.5 kg,双眼均无异常,置于长方形兔笼中,室温下(23~25 ℃)饲养,进食标准饲料。

1.2 试剂和仪器

NO、IL-1、IL-6和TNF-α ELISA试剂盒购于R&D公司;非接触式角膜内皮显微镜(SP-2000型)购于日本TOPCON公司;手术显微镜(Zeiss 200型)购于德国Zeiss公司;Protege超声乳化机购于美国STORS公司。

1.3 模型制备

采用剂量为3 mL/kg水合氯醛腹腔麻醉各组兔子,并用4%盐酸奥布卡因滴眼液对眼睛进行局部麻醉。使用美国Protege超声乳化仪(参数设置为乳化功率40 %,瓶高170 cm,负压33.25 kPa,有效乳化时间100 s)于上方巩膜缘后2 mm作巩膜隧道切口,长度约3.5 mm,穿刺入前房,注入0.25 mL粘弹剂Viscoat(Alcon公司);环行撕囊(直径约5 mm);超声乳化头置于中央区乳化吸出晶体核及皮质;手术结束后关闭切口;手术前后兔眼睛情况见图1。



a:手术前;b:手术后

图1 手术前后兔眼睛情况

1.4 手术后用药及指标检测

bFGF治疗组:滴用bFGF眼用凝胶(贝复舒眼用凝胶,珠海亿胜生物制药有限公司生产),每日滴用3次。对照组:滴用和bFGF眼用凝胶相同体积的生理盐水,与bFGF滴用方式和时间相同。观察记录术后2组眼睛消肿(恢复至0级)的时间。角膜水肿分级:角膜透明,无水肿为0级;角膜局限性薄雾状水肿,角膜内皮光滑为Ⅰ级;角膜浅灰色水肿,角膜内皮粗糙虹膜纹理不清为Ⅱ级;角膜弥散性灰白色水肿,角膜内皮呈龟裂状,虹膜纹理模糊为Ⅲ级;角膜乳白色水肿,眼内结构模糊为Ⅳ级[11]。分别于术后0、1、3、5、7 d往角膜手术切口处滴加1%荧光素染色,采用裂隙灯在钴蓝光下摄角膜像,用扫描仪将着色面积输入计算机经图像处理测量愈合面积,计算出不同时间角膜的愈合面积。术前和术后1、3、5周使用角膜内皮镜观察2组患者角膜厚度和角膜内皮细胞密度;术前和术后1、3、5周使用胰岛素针穿刺取前房水,每次每组取6只眼,每只眼取100 μl,利用ELISA检测前房水中NO、IL-1、IL-6和TNF-α水平。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行统计学处理,计数资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$为差异具有统计学意义,$P<0.01$为差异具有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 bFGF治疗缩短眼睛的消肿时间

手术后每天观察记录各组兔子眼睛的肿胀程度,记录每只眼睛消肿(恢复至0级)的时间。结果发现,bFGF治疗组术后眼睛消肿时间为(3.8±1.4)d,显著短于对照组的(6.5±2.1)d,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 bFGF治疗加速术后角膜切口的愈合

术后观察测量角膜切口的愈合面积显示(表1),与对照组相比,bFGF治疗组角膜切口愈合面积显著减少,差异具有统计学意义($P<0.05$),说明bFGF可以显著加速角膜切口的愈合。

2.3 bFGF治疗加速术后角膜内皮细胞密度和角膜厚度的恢复

通过观察计算各组治疗前及治疗后不同时间的角膜内皮细胞密度和角膜厚度,结果显示,与对照组比较,bFGF治疗可显著加速术后角膜内皮细胞密度和角膜厚度的恢复(图2)。

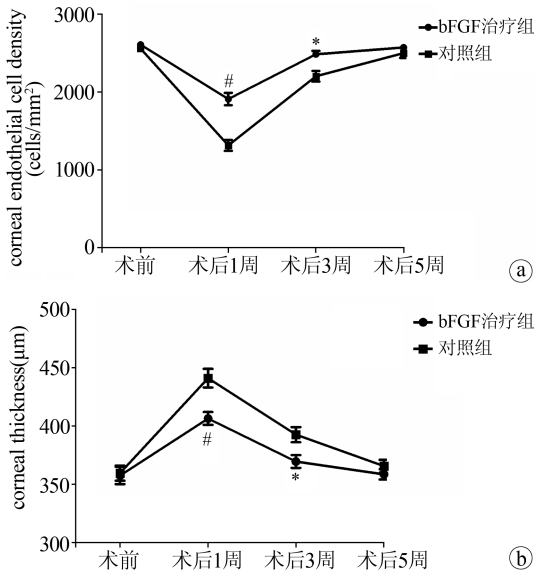
2.4 bFGF治疗促进前房水中炎症因子水平的降低

利用胰岛素针穿刺吸取术后不同时间各组的前房水,利用ELISA检测,结果显示,与对照组比较,bFGF治疗组术后1周和3周前房水中NO、IL-1、IL-6、TNF-α水平显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图3。

表1 2组术后角膜切口愈合面积($n=30$,mm^2)

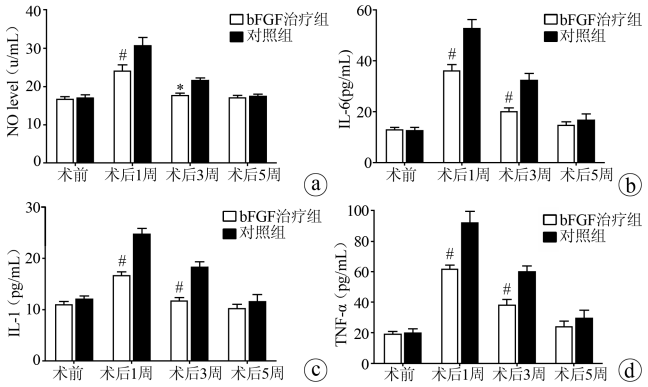
组别	术后0 d	术后1 d	术后3 d	术后5 d	术后7 d
bFGF治疗组	7.38±1.03	14.46±1.75*	32.13±1.87#	45.62±2.41#	47.17±2.61#
对照组	7.75±1.11	11.32±1.52	15.37±1.66	23.28±1.93	30.59±2.13

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.01$



a:角膜内皮细胞密度;b:角膜厚度 *:与正常对照组比较,$P<0.05$;#:与正常对照组比较,$P<0.01$

图2 2组术后角膜内皮细胞密度和角膜厚度



a:NO;b:IL-6;c:IL-1;d:TNF-α *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较 $P<0.01$

图3 2组术后前房水中NO、IL-1、IL-6、TNF-α含量变化

3 讨论

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是成纤维细胞生长因子家族的一员,在人体组织和哺乳动物体内广泛存在的一种多种功能的生长因子,在人和动物体内发挥重要的生物学效应[12-14]。研究发现,bFGF能促进神经外胚层和中胚层来源的细胞增殖,bFGF可以刺激神经轴突再生和Schwann细胞增生,从而达到修复神经的目的[15]。bFGF不仅可以通过调控胶原纤维等细胞外基质的合成与重构来加速角膜伤口的修复和愈合,在伤口愈合的早期起着比较关键的作用,还能够特异性结合靶细胞上的受体诱导角膜内皮细胞的移行,进而启动角膜内皮细胞的增殖,加速其生长和分化[9,16-17]。此外,bFGF还能够促进角膜上皮细胞增生,使增生的成纤维细胞和胶原纤维向正常生理结构方向排列,缩短修复时间,恢复角膜透明度,增强伤口愈合后的张力强度[9,18]。此外,bFGF具有促进体外培养的人角膜内皮细胞增殖和保持其生物学特性的功能[19]。虽然在内皮细胞、角膜上皮细胞和基质细胞都能够表达bFGF及其受体,但由于角膜组织愈合缓慢及其本身结构的特点,当角膜损伤后,及时补充适量的外源bFGF十分必要。本研究发现,利用bFGF治疗可以显著缩短白内障手术引起的眼睛消肿时间,促进角膜切口愈合。此外,通过观察测定角膜内皮细胞密度和角膜厚度发现,白内障手术后角膜内皮细胞出现显著的丢失,角膜厚度显著变厚,但是利用bFGF治疗可以显著促进其恢复。这些结果表明,白内障手术后利用bFGF治疗可以加速手术引起的角膜内皮细胞损伤的修复。

一氧化氮(NO)是一种在体内作用非常广泛的小分子化合物,少量的NO可以增加血管通透性、舒张血管等功能。但是在病理情况下,体内的刺激物如炎症因子、氧化物等可以刺激NO释放,高浓度的NO会引发细胞膜脂质氧化、细胞损伤以及细胞凋亡等病理现象。正常房水中含有微量的NO,可发挥调节眼内压等方面的生理功能。近年来的研究表明,NO作为细胞氧化损伤的重要物质参与到白内障的形成过程中,白内障患者的房水中存在大量的NO[20-23]。NO可能在白内障发生发展过程中起着重要作用,房水中高浓度的NO是一种较强的氧化剂,具有细胞毒性作用,可消耗细胞内ATP,增加细胞内Ca^{2+}的浓度,诱导细胞产生炎症反应,最终引起细胞凋亡[24-25]。本研究发现,白内障手术后前房水中NO水平显著升高,但是bFGF治疗可显著促进房水中NO水平的降低,表明bFGF可能是通过抑制角膜内皮细胞内的氧化应激水平,而加快角膜内皮细胞损伤的修复。

IL-1和TNF-α是重要的细胞因子,主要在炎症反应的早期释放[26]。由于残留的晶状体上皮细胞在体外具有产生IL-1的能力,其在人工晶状体术后的炎症反应中可能起着重要的作用,晶状体上皮细胞和人工晶状体之间通过相互作用刺激晶状体上皮细胞产生IL-1,其可以促进前列腺素的产生,最终导致血-房水屏障受到破坏[27]。有研究表明,囊外摘除白内障手术后,房水中的IL-1含量显著升高[28]。TNF-α主要由活化的单核巨噬细胞产生,可以刺激炎症细胞产生IL-1、IL-6等,其含量的高低可以反映机体炎症的水平[29]。本研究发现,白内障手术后前房水中IL-1、IL-6和TNF-α含量显著升高,但是bFGF治疗可显著加速房水中IL-1、IL-6和TNF-α水平的降低。根据此结果我

们推测 bFGF 加快角膜内皮细胞损伤的也可能与抑制角膜细胞内炎症反应有关。

综上所述,本研究发现 bFGF 可以明显加快角膜水肿消退,促进角膜切口更快愈合,在较短时间内使角膜内皮修复,并且能显著降低房水中 NO、IL-1、IL-6 和 TNF-α 水平,可为临床白内障手术引起的角膜损伤的治疗提供一种新的思路。

[参考文献]

[1] 景娇娜,张美莎,李一壮,等. 白内障手术对糖尿病患者角膜内皮细胞的影响[J]. 实用医学杂志,2013,29(8):1362 - 1363. doi:10.3969/j.issn.1006 - 5725.2013.08.067.

[2] 刘 婕,赵 娴,邵丽静,等. 白内障超声乳化吸除术后角膜内皮细胞变化的研究[J]. 国际眼科杂志,2014,14(12):2247 - 2249. doi:10.3980/j.issn.1672 - 5123.2014.12.39.

[3] 朱 妮,张仲臣. 白内障超声乳化手术与角膜内皮细胞损伤[J]. 国际眼科杂志,2013,13(7):1344 - 1347. doi:10.3980/j.issn.1672 - 5123.2013.07.13.

[4] 罗 涛,吴 燕,胡 峥,等. 角膜穿通伤伴白内障并发眼内炎的临床观察[J]. 局解手术学杂志,2015,24(3):341 - 342. doi:10.11659/jjssx.07E014051.

[5] Raghunathan VK,McKee C,Cheung W,et al. Influence of extracellular matrix proteins and substratum topography on corneal epithelial cell alignment and migration[J]. Tissue Eng Part A,2013,19(15 - 16):1713 - 1722. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0584.

[6] 罗文娟,林 静,王传富. 碱性成纤维细胞生长因子促进猫角膜内皮细胞的增殖作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(20):3911 - 3914. doi:10.3969/j.issn.1673 - 8225.2009.20.023.

[7] Abell RG,Kerr NM,Howie AR,et al. Effect of femtosecond laser-assisted cataract surgery on the corneal endothelium[J]. J Cataract & Refract Surg,2014,40(11):1777 - 1783. doi:10.1016/j.jcrs.2014.05.031.

[8] Misra SL,Goh YW,Patel DV,et al. Corneal microstructural changes in nerve fiber,endothelial and epithelial density after cataract surgery in patients with diabetes mellitus[J]. Cornea,2015,34(2):177 - 181. doi:10.1097/ICO.0000000000000320.

[9] 刘铁刚,施玉英,卢建民. 碱性成纤维细胞生长因子对白内障术后角膜恢复的初步观察[J]. 眼科新进展,2010,30(3):271 - 273.

[10] 聂庆珠,尹树国. 碱性成纤维细胞生长因子治疗兔角膜上皮及基质损伤的实验研究[J]. 中国实用眼科杂志,2000,18(6):340 - 343. doi:10.3760/cma.j.issn.1006 - 4443.2000.06.007.

[11] 王 红. 白内障超声乳化人工晶体植入术后角膜水肿的原因分析及其预防[J]. 中国老年学杂志,2011,31(13):2442 - 2443. doi:10.3969/j.issn.1005 - 9202.2011.13.025.

[12] Butko A,Bonat Celli G,Paulson A,et al. Entrapment of basic fibroblast growth factor (bFGF) in a succinylated chitosan nanoparticle delivery system and release profile[J]. J Biomater Sci Polym Ed,2016:1 - 13. doi:10.1080/09205063.2016.1178519.

[13] Rapraeger AC,Krufka A,Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation[J]. Science,1991,252(5013):1705 - 1708. doi:10.1126/science.1646484.

[14] Kandel J,Bossy-Wetzel E,Radvanyi F,et al. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma[J]. Cell,1991,66(6):1095 - 1104. doi:10.1016/0092 - 8674(91)90033 - U.

[15] 刘焕兴,季日旭,麻光喜,等. 碱性成纤维细胞生长因子注射方式及剂量对大鼠外周神经损伤修复的影响[J]. 医药导报,2014,33(1):5 - 7. doi:10.3870/yydb.2014.01.002.

[16] 朱洪燕,蔡小军,李青春. 老年核性及皮质性白内障晶状体上皮细胞中 bFGF 及 α-SMA 的表达[J]. 眼科新进展,2008,28(1):33 - 36.

[17] 屈纪富,程天民,许霖水,等. 合并全身放射损伤创伤局部 FGF-2 和 NGF 含量的变化及其意义[C]//中华医学会放射医学与防护学分会第三次全国中青年学术交流会论文汇编,2001:117 - 118.

[18] 罗 媛,赵艳婷,林秋蓉,等. 表皮生长因子对糖尿病大鼠角膜上皮损伤修复影响的研究[J]. 海峡科学,2012(11):38 - 39. doi:10.3969/j.issn.1673 - 8683.2012.11.008.

[19] Feng DF,Wang CY,Wang H,et al. bFGF-induced human periodontal ligament fibroblasts proliferation through T-type voltage-dependent calcium channels[J]. Acta Odontol Scand,2013,71(1):9 - 14. doi:10.3109/00016357.2011.645067.

[20] 阎洪禄,刘红霞. 一氧化氮及其合酶在白内障形成过程中的作用[J]. 中华眼科杂志,2004,40(8):561 - 562. doi:10.3760/j:issn:0412 - 4081.2004.08.015.

[21] 王冬兰,朱耘丽,杨笑天,等. 老年性白内障晶体一氧化氮和一氧化氮合成酶的生化检测[J]. 中国实用眼科杂志,2001,19(2):120 - 121. doi:10.3760/cma.j.issn.1006 - 4443.2001.02.012.

[22] 牛耘丽,王惠英. 老年性白内障晶状体 NO 和 NOS 的生化研究[J]. 同济大学学报(医学版),2005,26(1):30 - 31. doi:10.3969/j.issn.1008 - 0392.2005.01.008.

[23] Wang R,Ghahary A,Shen YJ,et al. iNitrc oxide synthase expression and nitirc oxide production are reduced in hypertropic scar tissue and fibroblast[J]. J Invest Dermatol,1997,108:438 - 444. doi:10.1111/1523 - 1747.ep12289708.

[24] 沈惠芳,谢 欣. 白内障患者血清、房水及泪液中 IL-2,sIL-2,NO,TAC 及 SOD 的变化研究[J]. 国际眼科杂志,2014,14(9):1635 - 1637. doi:10.3980/j.issn.1672 - 5123.2014.09.22.

[25] 黄秀榕,祁明信,沈世仁,等. 白内障术后房水一氧化氮及一氧化氮合酶的动态变化[J]. 眼科研究,2001,19(1):16 - 18. doi:10.3760/cma.j.issn.2095 - 0160.2001.01.006.

[26] 刘城城,韩广玮,陈江川,等. 牙周炎对慢性细菌性前列腺炎大鼠前列腺的影响[J]. 局解手术学杂志,2015,24(1):6 - 10. doi:10.11659/jjssx.07E014039.

[27] Wang HM,Li GX,Zheng HS,et al. Protective effect of resveratrol on lens epithelial cell apoptosis in diabetic cataract rat[J]. Asian Pac J Trop Med,2015,8(2):153 - 156. doi:10.1016/S1995 - 7645(14)60307 - 2.

[28] 周朝晖,何守志. 外伤性白内障摘除人工晶体植入术后房水炎细胞研究[J]. 眼科新进展,1997(4):203 - 205.

[29] 杜 冰,唐 松,黄丽娜,等. 兔外伤性白内障囊外摘除术后房水细胞因子的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(2):261 - 263. doi:10.3321/j.issn:1673 - 8225.2007.02.019.

(编辑:刘 艺)