· 实验研究 ·

# 后囊膜混浊的体外上皮-间质转化模型的建立

杨宝霞　王晔　赵晓雯　刘廷　黄钰森

250355 济南大学　山东省医学科学院　医学与生命科学学院(杨宝霞);266071 青岛,山东省医学科学院　山东省眼科研究所　山东省眼科学重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地(王晔、赵晓雯、刘廷、黄钰森)

通信作者:黄钰森,Email:huang_yusen@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.03.004

【摘要】 **背景**　上皮-间质转化(EMT)是导致后囊膜混浊(PCO)的主要发病机制之一,研究 LECs 的 EMT 过程对 PCO 的防治具有重要意义,但目前缺乏研究 EMT 的 PCO 体外细胞模型。 **目的**　建立新的人晶状体囊外摘出术 PCO 的体外囊袋培养模型,探讨 PCO 形成过程中 LECs EMT 的发生情况。 **方法**　利用健康供体的 40 只尸眼行体外模拟的白内障摘出术,游离晶状体囊袋后用昆虫针固定于培养皿,置于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中培养 4 周,分别于培养后 0、3、7、14 和 28 d 在光学显微镜下观察培养囊袋中 LECs 的生长情况;收集 0、3、7 和 28 d 的囊袋组织制备组织病理学切片,采用苏木精-伊红染色法检测囊袋上 LECs 的细胞形态;采用免疫组织化学染色法检测 EMT 标志物 α-SMA、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白在囊袋上 LECs 中的表达和定位;采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测不同时间点囊袋上 LECs 中 α-SMA、E-cadherin 和 Vimentin mRNA 及其蛋白的表达变化。 **结果**　未进行培养的囊袋后囊膜上未发现 LECs 生长,囊袋培养后 3 d 可见后囊膜周边出现 LECs 并逐渐向中央区增生,培养后 7 d LECs 完全覆盖后囊膜,略呈铺路石样外观并出现皱褶,此后随着培养时间的延长皱褶的数量增多并伸长,囊袋张力增强。免疫组织化学染色结果显示,随培养时间的延长,囊袋上 LECs 中 E-cadherin 的表达强度逐渐下降,而 α-SMA 和 Vimentin 的表达强度逐渐增强。实时荧光定量 PCR 检测表明,培养后 0、3、7、14 和 28 d 囊袋上 LECs 中 E-cadherin mRNA 的相对表达量分别为 3.35±0.13、1.47±0.20、1.13±0.14、1.00±0.85 和 0.23±0.03,Vimentin mRNA 的相对表达量分别为 1.00±0.73、1.05±0.14、2.24±0.43、2.84±0.34 和 8.570±0.40,α-SMA mRNA 的相对表达量分别为 1.00±0.06、2.68±0.28、4.24±0.05、2.05±0.90 和 15.30±0.19,总体比较差异均有统计学意义(E-cadherin mRNA:$F$ = 23.430, $P$ = 0.000;Vimentin mRNA:$F$ = 8.915, $P$ = 0.002;α-SMA mRNA:$F$ = 103.500, $P$ = 0.000),其中培养后 28 d 囊袋上 LECs 中 E-cadherin mRNA 的相对表达量最低,而 Vimentin mRNA 和 α-SMA mRNA 的相对表达量均最高,差异均有统计学意义(均 $P$<0.01)。Western blot 检测结果表明,培养后 0、3 和 28 d 囊袋上 LECs 中 E-cadherhin 蛋白表达的灰度值分别为 1.443±0.017、1.023±0.003 和 0.568±0.018,Vimentin 蛋白表达的灰度值分别为 0.565±0.012,1.156±0.007 和 1.241±0.009,α-SMA 蛋白表达的灰度值分别为 0.195±0.045,0.693±0.036 和 1.501±0.005,总体比较差异均有统计学意义(E-cadherhin:$F$ = 2 787.000, $P$ = 0.000;Vimentin:$F$ = 4 488.000, $P$ = 0.000;α-SMA:$F$ = 1 173.000, $P$ = 0.000),其中培养后 3、28 d LECs 中 E-cadherhin蛋白表达明显低于 0 d,而 Vimentin 和 α-SMA 蛋白表达明显高于 0 d,差异有统计学意义($P$<0.05)。 **结论**　本研究中的新囊袋模型进行 LECs 体外培养能模拟体内白内障术后晶状体后囊 LECs 的 EMT 自然过程,是探讨 PCO 发生机制和方法新的体外细胞模型。

【关键词】 上皮-间质转化; 晶状体上皮细胞; 后发性白内障; 白内障摘出/不良反应; 晶状体囊; 细胞培养; 人; 囊袋模型

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81370990、81370996); 山东省自然科学基金项目 (ZR2012HM009、BS2012YY030)

***In vitro* epithelial-mesenchymal transition model for LECs of human posterior capsule opacification**

*Yang Baoxia, Wang Ye, Zhao Xiaowen, Liu Ting, Huang Yusen*

*School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250355, China (Yang BX); Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China (Wang Y, Zhao XW, Liu T, Huang YS)*

*Corresponding author: Huang Yusen, Email: huang_yusen@126.com*

[**Abstract**] **Background**　Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is one of the pathogenesis mechanisms

中华医学会杂志社 版权所有 违者必究　Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

of posterior capule opcification (PCO). Studying EMT is of important significance for the prevention and treatment of PCO. However, EMT model is lack. **Objective** This study was to establish an *in vitro* EMT model for the study of human PCO. **Methods** *In vitro* mimic cataract enucleation was performed on 40 donor eyes, including anterior capsulorhexis, nucleus hydroexpression, and aspiration of lens fibers. The capsular bag of lens was dissected free during the surgery and pinned flat on a plastic culture dish with DMEM/F12 supplemented containing 10% fetal bovine serum for 4 weeks. The proliferation of LECs on the capsular bag was observed by phase-contrast and dark-field microscope in 0, 3, 7, 14 and 28 days after culture. The capsular bag tissues were collected in cultured 0, 3, 7 and 28 days for the preparation of sections and hematoxylin-eosin stain, and the growth and morphology of LECs were examined with optical microscope. The expression and location of α-SMA, E-cadherin and Vimentin were assessed by immunochemistry. The expression levels of α-SMA, E-cadherin and Vimentin mRNA and proteins were detected by using real-time fluorescnce quantitative PCR and Western blot in different time points. **Results** No LECs were seen on the uncultured capsular bag. LECs appeared in cultured day 3 on the periphery capsular bag and grew toward the center and covered the posterior capsule 7 days after cultured, with a cobblestone-like appearance. Wrinkles occurred and extended gradually along with the enhancement of bag tension. Immunochestry showed that the expression intensity of E-cadherin in the capsular bag gradually weakened, and that of α-SMA or Vimentin was gradually enhanced during the culture duration. The relative expression levels of E-cadherhin mRNA at 0, 3, 7, 14 and 28 days after culture were 3.35±0.13, 1.47±0.20, 1.13±0.14, 1.00±0.85 and 0.23±0.03, and relative expression levels of Vimentin mRNA were 1.00±0.73, 1.05±0.14, 2.24±0.43, 2.84±0.34 and 8.57±0.40, and those of α-SMA mRNA were 1.00±0.06, 2.68±0.28, 4.24±0.05, 2.05±0.90 and 15.30±0.19, showing significant differences among different time points (E-cadherhin mRNA: $F=23.430$, $P=0.000$; Vimentin mRNA $F=8.915$, $P=0.002$; α-SMA mRNA: $F=103.500$, $P=0.000$), with the lowest expression levels in the E-cadherhin mRNA and the highest expression levels in the Vimentin mRNA and α-SMA mRNA at 28 days during the culture period (all at $P<0.01$). The gray values of E-cadherin protein expression were 1.443±0.017, 1.023±0.003 and 0.568±0.018, and those of Vimentin protein were 0.565±0.012, 1.156±0.007 and 1.241±0.009, and those of α-SMA protein were 0.195±0.045, 0.693±0.036 and 1.501±0.005 at 0, 3 and 28 days, with significnant differences among various time points (E-cadherin: $F=2\,787.000$, $P=0.000$; Vimentin: $F=4\,488.000$, $P=0.000$; α-SMA: $F=1\,173.000$, $P=0.000$). The expression levels were significantly declined in E-cadherhin protein and elevated in Vimentin and α-SMA proteins at 3 and 28 days after culture in comparison with before culture. **Conclusions** A novel *in vitro* EMT model of LECs is established in this study. This model can mimic a natural EMT procedure after extracapsular cataract enucleation and therefore is a useful model for the further research of the mechanism and prevention and treatment of PCO.

[**Key words**] Epithelial-mesenchymal transition; Epithelial cells, lens; Posterior capsular opacification; Cataract extraction/adverse effects; Lens capsule; Cells, cultured; Humans; Capsular package model

**Fund program**: National Natural Science Foundation of China (81370990, 81370996); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2012HM009, BS2012YY030)

晶状体后囊膜混浊(posterior capsule opacification, PCO)又称后发性白内障,是白内障超声乳化摘出联合 IOL 植入术后常见的并发症,是导致术后视力降低的主要原因[1-2],也是影响 IOL 的研究和开发及进一步临床应用的原因之一。因此,如何防治 PCO 一直是白内障领域研究的热点[3]。PCO 的形成过程是创伤修复的过程,与白内障术后晶状体后囊膜残存的 LECs 增生和纤维化过程有关[4-5]。研究表明,LECs 的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在前囊膜型白内障和 PCO 发病机制中的作用至关重要[6-8],抑制残存 LECs 的 EMT 过程可有效抑制 PCO 的发生及发展[9],目前采用离体 LECs 和模型动物是开展此类研究[10-13]的重要方法。传统的 LECs 体外培养方法比较繁琐,一般仅取第 2 ~ 3 代的细胞进行研究,多次传代后细胞的增生潜能逐渐衰减,且传统的方法适合单纯的 LECs,未能考虑到后囊膜的变化因素。此外,目前也常有研究者采用永生化的晶状体上皮细胞系,但是该细胞系很难获得广泛认可[14],同时这些细胞在培养时需添加较高浓度的胎牛血清,干扰实验结果,故上述体外细胞模型均很难真实反映体内 PCO 的自然病程。目前 PCO 研究中使用的动物模型制作过程过于复杂,代价较高,动物种属的不同也可导致实验结果无法比较。近来有研究者提出应用器官培养方法,即体外囊袋模型进行 PCO 的研究,认为这种方法能提供稳定的体外环境,最大程度地模拟人白内障术后相关组织的形态学改变及细胞的分子生物学行为,但这些方法仍在探索过程中。本研究中利用尸眼建立 EMT 参与的 PCO 体外囊袋模型,为探讨 PCO 发病机制和防治研究提供新的体外细胞模型。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

**1.1.1** 细胞来源　人晶状体摘出术后残留在晶状体囊膜的 LECs。

**1.1.2** 主要试剂及仪器　胎牛血清、DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司);兔抗人 α-SMA 抗体、兔抗人 E-cadherin 抗体、兔抗人 Vimentin 抗体(英国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 公司);EliVision™ plus 检测试剂盒、DAB 染色液(福州迈新生物技术开发有限公司);ECL 发光试剂盒(北京碧云天生物技术研究所);RNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司);cDNA 合成第一链试剂盒(大连 Takara 公司);Real Master Mix(SYBR Green)(北京天根生化科技有限公司)。实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

**1.2** 方法

**1.2.1** 体外人晶状体囊袋模型的建立　本研究中 40 只尸眼均由青岛眼科医院眼库提供,已通过山东省眼科研究所伦理学委员会批准。供体年龄为 20~30 岁,均无白内障等相关疾病。囊袋游离方法:庆大霉素浸泡眼球消毒 10 min,解剖显微镜下环形剪除角膜,放射状剪开虹膜至睫状体区,剪除虹膜后用截囊针在前囊膜行连续环形撕囊,直径约为 5.5 mm。平衡盐溶液充分水分离,去除晶状体核及皮质,剪断悬韧带,游离晶状体囊袋,以 4~6 根昆虫针将其固定于培养皿中,以保持囊袋呈圆形的外观并维持一定的张力。将晶状体囊袋移至培养板,添加含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,于 37 ℃、体积分数 5% $CO_2$ 培养箱中培养 4 周,每 3 天更换 1 次培养液,每 24 小时在倒置相差显微镜下观察,评估后囊膜上 LECs 的生长情况。待细胞完全覆盖后囊后,改为每 3 天观察 1 次。

**1.2.2** 晶状体囊袋模型的组织病理学观察　分别于晶状体囊袋培养后 0、3、7 和 28 d 将囊袋置于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,常规石蜡包埋后 4 μm厚连续切片,行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察 LECs 的增生变化。

**1.2.3** 免疫组织化学染色检测晶状体囊袋模型中 EMT 标志物蛋白的表达　分别于晶状体囊袋培养后 3、7 和 28 d 将囊袋置于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,石蜡包埋后 4 μm 厚连续切片。石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化;在枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)中高温修复 10 min;体积分数 3% $H_2O_2$ 室温封闭 10 min 以消除内源性过氧化物酶,PBS 洗 3 min,冲洗 3 次;正常非免疫动物血清封闭 30 min。除去血清,标本周围免疫组织化学笔画圈;分别滴加兔抗人 α-SMA 一抗(ab5694,1∶200)、兔抗人 E-cadherin 一抗(ab76055,1∶200)和兔抗人 Vimentin 一抗(EPR3776,1∶200),以 PBS 抗体缓冲液作为阴性对照,4 ℃孵育过夜,PBS 冲洗 3 min,共 3 次;滴加 1 滴聚合物增强剂(试剂 A),室温孵育 20 min,PBS 冲洗 3 min,共 3 次;加 50 μl 二抗,室温孵育 30 min,PBS 冲洗 3 min,共 3 次。滴加 DAB 工作液,光学显微镜下控制显色 5 min;苏木素复染 1~2 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜下检测囊袋中 α-SMA、E-cadherin和 Vimentin 的表达。利用 Nikon 显微摄像系统采集图像,采用 Image J 软件计算染色面积百分数。

**1.2.4** 荧光定量 PCR 法检测囊袋中 α-SMA、E-cadherin和 Vimentin mRNA 的表达　分别将体外培养不同时间点的 15 只晶状体囊袋模型取出后剪碎,采用 Qiagen RNA 提取试剂盒,按照说明书提取总 RNA。采用 Takara 公司的逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板构建特异性引物(表 1)。总反应体系为 20.00 μl,其中 cDNA 模板 0.50 μl,上下游引物各 0.25 μl,$ddH_2O$ 11.00 μl,20 倍 SYBR+2.5 倍 Mastermix(125.00 μl 20 倍 SYBR 与 1.0 ml 2.5 倍 Mastermix 混合)8.00 μl。每个样本设 3 个复孔。反应条件:95 ℃热启动 10 min;95 ℃变性 15 s,60 ℃退火延伸 1 min,40 个循环。反应完成后根据 Ct 值比较目的基因的相对表达量,以 0 d 为对照检测培养后 3、7、14、28 d 囊袋中 α-SMA、E-cadherin 和 Vimentin mRNA 的表达。以 GAPDH 作为内参,采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 α-SMA、E-cadherin 和 Vimentin mRNA 的相对表达量。

**表 1　目的基因的 PCR 引物序列**

| 基因 | 引物序列 | 探针序列 | 产物大小(bp) |
|---|---|---|---|
| *E-cadherin* NM_004360.3 | F:5'-GCCCAGAAAATGAAAAAGG-3'<br>R:5'-GTGTATGTGGCAATGCGTTC-3' | AAGGTGACAGAGCCTCTGGA | 200 |
| *Vimentin* NM_003380.3 | F:5'-GAGAACTTTGCCGTTGAAGC-3'<br>R:5'-TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT-3' | AGATGGCCCTTGACATTGAG | 170 |
| *α-SMA* NM_001141945 | F:5'-TTCAATGTCCCAGCCATGTA-3'<br>R:5'-GAAGGAATAGCCACGCTCAG-3' | ACCCACAATGTCCCCATCTA | 222 |
| *GAPDH* NM_004360.3 | F:5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'<br>R:5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3' | CGACCACTTTGTCAAGCTCA | 245 |

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

**1.2.5**　Western blot 法检测囊袋中 α-SMA、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白的表达　将体外培养不同时间点的 9 只晶状体囊袋模型取出后剪碎，加入含质量分数 0.1% 苯甲基磺酰氟（phenylmthanesulfonyl fluoride，PMSF）的 RIPA 蛋白裂解液中提取总蛋白，采用 BCA 法测定蛋白浓度，调整至 1 mg/ml。每组样本各取 10 μg总蛋白行质量分数 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳结束后于 100 mA 转膜 3 h 至聚偏氟乙烯膜（polyvinylidene fluoride，PVDF）上，质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭1 h，分别滴加兔抗人 α-SMA 一抗、兔抗人 E-cadherin 一抗（1∶200）和兔抗人 Vimentin 一抗（1∶200）4 ℃过夜孵育，用含质量分数 0.1% 吐温-20 的 PBS 洗膜后，加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗（1∶2 500）室温孵育 1 h，化学发光试剂显影并成像。GAPDH 为内参，通过对比蛋白灰度值进行分析。

### 1.3　统计学方法

采用 Graph Pad Prism 5 软件（GPW5-384305-RAG-5235 USA，GraphPad Software）自带的统计学分析模块进行统计学分析，采用软件 GraphPad Prism 5 绘制柱形图。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验呈正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间数据资料经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组多水平实验设计，晶状体囊袋培养不同时间点间囊袋上 LECs 中 α-SMA、E-cadherin 和 Vimentin mRNA 及其蛋白表达量的总体差异比较采用单因素方差分析，各时间点间多重比较采用 Tukey 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结果

### 2.1　囊袋模型上 LECs 生长情况

晶状体囊袋模型制作后 2 ~ 3 d，后囊膜上 LECs 开始出现，细胞由囊膜周边逐渐向中央区增生，前缘的细胞排列松散，形态不规则，细胞体较大，增生速度快，后方的细胞排列紧密，呈铺路石样外观。造模后 6 ~ 8 d 细胞完全覆盖囊膜。此后，细胞继续增生并出现皱褶，随着培养时间的延长皱褶的数量逐渐增多并伸长，囊袋张力逐渐增强。上述现象与白内障超声乳化术后晶状体囊膜的在体变化过程相符（图 1）。

### 2.2　晶状体囊袋模型的组织病理学表现

苏木精-伊红染色结果表明，未培养的后囊膜上未见 LECs，仅见均一的淡染色结构（图 2A）；囊袋培养后 3 d 囊膜周边部可见少量 LECs 开始长出，细胞核呈圆形或椭圆形，染色深（图 2B）；囊袋培养后 7 d，后囊被覆一层排列较为紧密、细胞核深染、细胞质丰富的 LECs（图 2C）；囊袋培养后 28 d，后囊膜上可见双层和多层 LECs（图 2D）。

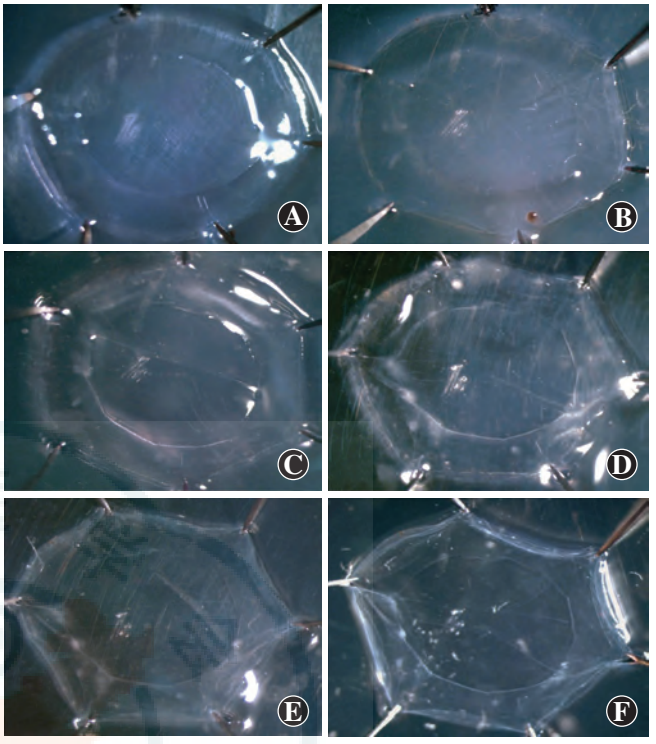



**图 1　LECs 在晶状体囊袋模型上的生长情况**　造模后 2 ~ 3 d，后囊膜上可见 LECs 由囊膜周边向中央区生长，造模后 6 ~ 8 d 细胞覆盖后囊膜，可见后囊膜皱褶，且随着培养时间的延长，皱褶的数量增加　A：培养前　B：造模后 3 d　C：造模后 7 d　D：造模后 14 d　E：造模后 21 d　F：造模后 28 d

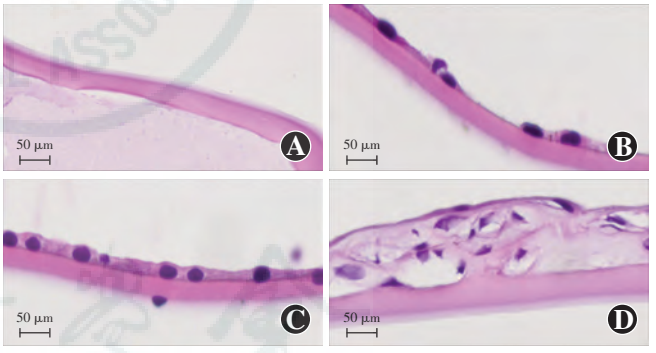



**图 2　晶状体囊袋的组织病理学检查**（HE ×400，标尺 = 50 μm）　A：未经培养的后囊膜为均一染色结果　B：囊袋培养后 3 d，可见后囊膜上有少量 LECs　C：囊袋培养后 7 d，后囊膜上可见细胞质丰富、细胞核深染的 LECs，细胞排列紧密　D：囊袋培养后 28 d，后囊膜上可见双层和多层 LECs

### 2.3　α-SMA、E-cadherin 和 Vimentin 在囊袋培养模型上的表达及定位

随着培养时间的延长，E-cadherin 在囊袋培养模型中 LECs 中的表达强度逐渐减弱，培养后 28 d 未检测到 E-cadherin 表达（图 3）。囊袋培养后 0 ~ 3 d LECs 中未见 Vimentin 和 α-SMA 的阳性表达，随着培养时间的延长，Vimentin 和 α-SMA 的表达强度逐渐增加，培养后 28 d LECs 中 Vimentin（图 4）和 α-SMA（图 5）均

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

呈强阳性表达。囊袋培养后 3、7 和 28 d 时囊膜中 E-cadherin的染色面积百分比分别为(22.45±0.76)%、(9.91±0.59)%和(0.68±0.10)%,各时间点间总体比较差异有统计学意义($F$=383.541,$P$=0.000);上述各时间点囊膜 LECs 中 Vimentin 染色面积百分比分别为(0.43±0.06)%、(17.04±0.95)%和(32.32±0.51)%,总体比较差异有统计学意义($F$=651.850,$P$=0.000);上述各时间点囊膜 LECs 中 α-SMA 染色面积百分比分别为(0.18±0.02)%、(5.87±0.14)%和(18.83±0.23)%,总体比较差异有统计学意义($F$=3 808.229,$P$=0.000),其中囊袋培养后 28 d 囊膜 LECs 中 E-cadherin 染色面积百分比明显低于培养 3 和 7 d,而 Vimentin 和 α-SMA 染色面积百分比均明显高于培养 3 和 7 d,差异均有统计学意义(均 $P$<0.01)(图 6)。

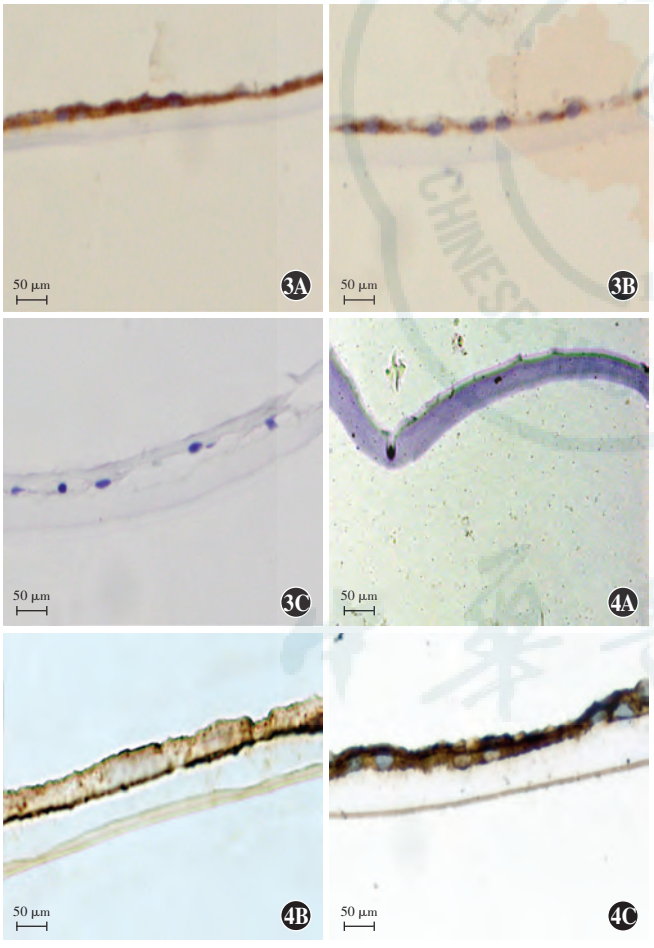



**图 3　E-cadherin 在囊袋上 LECs 中的表达和定位**(DAB　标尺=50 μm)　A:囊袋培养后 3 d,可见 LECs 中 E-cadherin 表达呈棕黄色染色　B:囊袋培养后 7 d,LECs 中 E-cadherin 表达强度减弱,呈淡棕色染色　C:囊袋培养后 28 d,LECs 中未见到 E-cadherin 的表达　**图 4　Vimentin 在囊袋上 LECs 中的表达和定位**(DAB　标尺=50 μm)　A:囊袋培养后 3 d,LECs 中未见到 Vimentin 表达　B:囊袋培养 7 d,LECs 中可见 Vimentin 呈阳性表达,呈棕黄色染色　C:囊袋培养 28 d,LECs 中 Vimentin 呈强阳性表达,为深棕色染色

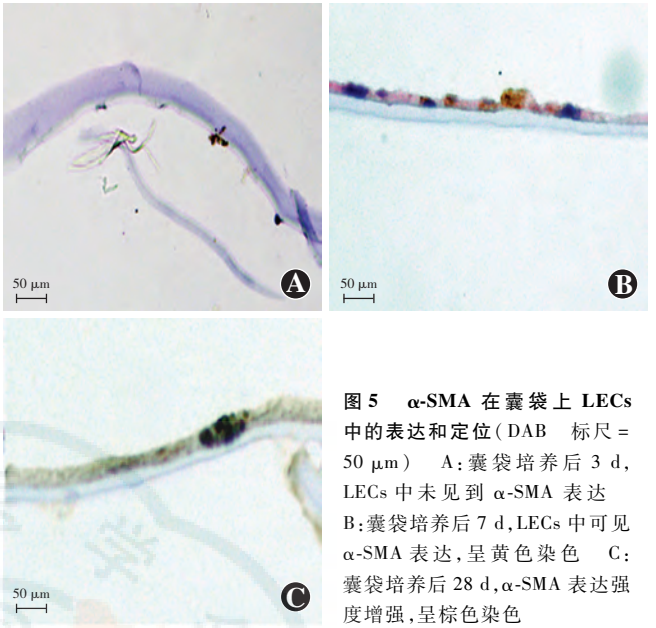



**图 5　α-SMA 在囊袋上 LECs 中的表达和定位**(DAB　标尺=50 μm)　A:囊袋培养后 3 d,LECs 中未见到 α-SMA 表达　B:囊袋培养后 7 d,LECs 中可见 α-SMA 表达,呈黄色染色　C:囊袋培养后 28 d,α-SMA 表达强度增强,呈棕色染色

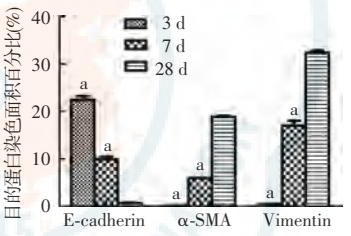



**图 6　囊袋培养模型中 E-cadherin、α-SMA 和 Vimentin 的染色面积百分比比较**
E-cadherin: $F$ = 383.541, $P$ = 0.000; Vimentin: $F$ = 651.850, $P$=0.002; α-SMA: $F$=3 808.229, $P$=0.000. 与各自的培养后 28 d 值比较,$^aP$<0.01(单因素方差分析,LSD-$t$ 检验,$n$=3)

## 2.4　囊袋培养模型上囊膜中 E-cadherin、Vimentin 和 α-SMA mRNA 的相对表达

荧光定量 PCR 检测结果表明,囊袋培养 0、3、7、14 和 28 d 时囊膜中 E-cadherin mRNA 的相对表达量分别为 3.35±0.13、1.47±0.20、1.13±0.14、1.00±0.85 和 0.23±0.03,各时间点间总体比较差异有统计学意义($F$ = 23.430, $P$ = 0.000);上述各时间点囊膜中 Vimentin mRNA 的相对表达量分别为 1.00±0.73、1.05±0.14、2.24±0.43、2.84±0.34 和 8.57±0.40,总体比较差异有统计学意义($F$=8.915,$P$=0.002);上述各时间点囊膜中 α-SMA mRNA 的相对表达量分别为 1.00±0.06、2.68±0.28、4.24±0.05、2.05±0.90 和 15.30±0.19,总体比较差异有统计学意义($F$=103.500,$P$=0.000);其中囊袋培养后 28 d,囊膜中 E-cadherin mRNA 的相对表达量明显低于培养后 0、3、7、14 d,而 Vimentin mRNA 和 α-SMA mRNA 的相对表达量均明显高于培养 0、3、7、14 d,差异均有统计学意义(均 $P$<0.01)(图 7)。

## 2.5　E-cadherin、Vimentin 和 α-SMA 蛋白在囊袋模型中的表达

Western blot 检测结果表明,囊袋培养后 0、3 和

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

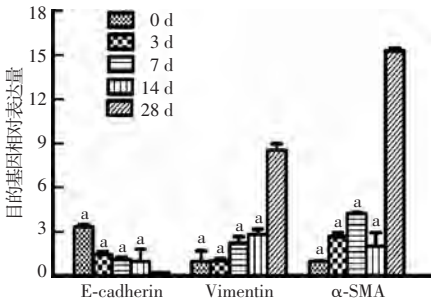



**图 7　荧光定量 PCR 法检测 E-cadherin、Vimentin 和 α-SMA mRNA 的相对表达**　E-cadherin mRNA：$F=23.430$，$P=0.000$；Vimentin mRNA：$F=8.915$，$P=0.002$；α-SMA mRNA：$F=103.500$，$P=0.000$. 与各自的培养后 28 d值比较，[a]$P<0.01$（单因素方差分析，LSD-$t$ 检验，$n=3$）

28 d时囊袋模型中 E-cadherin 蛋白表达的灰度值分别为 1.443±0.017、1.023±0.003 和 0.568±0.018，总体比较差异有统计学意义（$F=2\,787.000$，$P=0.000$）；上述时间点 Vimentin 蛋白表达的灰度值分别为 0.565±0.012、1.156±0.007 和 1.241±0.009，总体比较差异有统计学意义（$F=4\,488.000$，$P=0.000$）；上述时间点 α-SMA 蛋白表达的灰度值分别为 0.195±0.045、0.693±0.036 和 1.501±0.005，总体比较差异有统计学意义（$F=1\,173.000$，$P=0.000$）。囊袋培养后 3 d 和 28 d，囊袋模型中 E-cadherin 蛋白表达的灰度值均明显低于培养后 0 d，Vimentin 和 α-SMA 蛋白表达的灰度值均明显高于培养后 0 d，差异均有统计学意义（均 $P<0.01$）；囊袋培养后 28 d 囊袋模型中 E-cadherin 蛋白表达的灰度值均明显低于培养后 3 d，α-SMA 蛋白表达的灰度值均明显高于培养后 3 d，差异均有统计学意义（均 $P<0.01$）（图 8）。

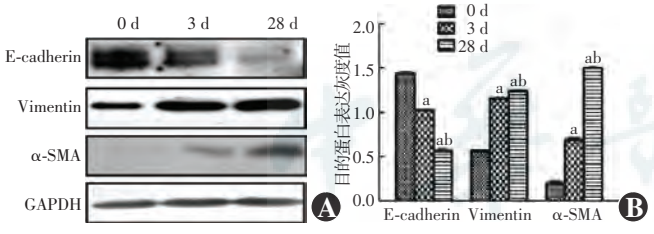



**图 8　E-cadherin、Vimentin 和 α-SMA 在囊袋模型中的表达量比较**　A：各时间点各目的蛋白在囊袋模型中表达的 Western blot 分析　B：各时间点各目的蛋白在囊袋模型中表达的量化比较　E-cadherin 蛋白：$F=2\,787.000$，$P=0.000$；Vimentin 蛋白：$F=4\,488.000$，$P=0.0001$；α-SMA 蛋白：$F=1\,173.000$，$P=0.000$. 与各自的培养后 0 d 值比较，[a]$P<0.01$；与各自的培养后 3 d 值比较，[b]$P<0.01$（单因素方差分析，LSD-$t$ 检验，$n=3$）

## 3　讨论

应用囊袋法进行 LECs 体外培养可模拟体内白内障摘出术后 LECs 的增生规律，并保留完整后囊，较以往单纯的 LECs 培养方法简单，干扰因素少，可以建立持续稳定的 LECs 体外的生长环境，较为真实地反映体内白内障摘出术后的多种病理变化。在本研究中采用昆虫针固定晶状体囊袋，使其保持一定的张力和圆形外观，体外培养的后囊膜上可见 LECs 增生、移行和皱褶形成，囊袋张力逐渐增强，这些变化与体内变化方式接近。因此本研究中建立的 PCO 囊袋培养模型为探讨 PCO 的发生机制提供了良好的体外实验模型，为进一步研究和防治 PCO 的方法提供了方法学基础。

EMT 机制最早是在胚胎发育中发现的，胚胎发育过程中存在上皮细胞与间质细胞相互转换的现象，在这个过程中上皮细胞失去其分化的表型并发生形态学改变，重新编程为间质细胞[15-16]。目前共发现 3 种类型的 EMT，LECs 发生的 EMT 属于第 2 种类型的 EMT[17-18]。白内障术后 EMT 的发生是 LECs 损伤修复的关键，同时也是导致 PCO 形成的主要原因之一[19-20]。

EMT 是细胞转型的重要机制之一，这种转型过程受到 E-cadherin 介导的细胞间黏附分子、生长因子和细胞外基质成分的调节[21]。上皮细胞有很强的极性，细胞排列整齐，细胞间黏附紧密，这些主要取决于细胞骨架蛋白（如 α-SMA）和细胞膜黏附分子的功能[22]。当这些分子发生变化时，细胞间连接就变得弱，细胞呈散在生长，细胞极性消失，即转变为间充质细胞；反之则由间充质细胞转变为上皮细胞。当细胞由上皮细胞转变为间充质细胞后，由于 E-cadherin等的调节，细胞黏附能力下降，细胞移行能力增强。研究表明，E-cadherin、Vimentin 和 α-SMA 是 EMT 过程中的常见标志物，其中 E-cadherin 是上皮细胞标志物，Vimentin 和 α-SMA 是间质细胞标志物。E-cadherin 可维持细胞间的紧密连接，阻止细胞活动的侵袭、转移或扩散。α-SMA 与 Vimentin 的表达显著上调是 EMT 过程中的特征性变化，发生 EMT 的细胞在形态学上则有异常的增生、分化和迁移等表现。本研究中发现在囊袋培养过程中，LECs 中 E-cadherin蛋白的表达随培养时间的延长而逐渐下降，而 α-SMA 和 Vimentin 的表达则较培养初期显著上升，由此可见，囊袋培养过程中发生了 EMT。

目前有几种不同的晶状体囊袋培养方法，主要的手段都是张力环植入或昆虫针固定。Saxby 等[23]采用硅胶环植入的方法研究 LECs 的增生与迁移方式，El-Osta 等[24]采用一种自制的硅胶支撑物，并加以黏弹剂的方法建立人 PCO 的体外模型，Burger 等[25]改进了上述培养方法，通过植入张力环建立 PCO 的体外模型。上述方法都可以模拟体外 LECs

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

增生及迁移等生物学过程，但是与本研究中的新型体外囊袋培养模型的培养方法相比，其细胞爬满后囊膜所需的时间更长，而上述方法操作比较复杂，有时会造成囊袋的撕裂，导致囊袋培养失败。本研究中借鉴 Liu 等[26]采用昆虫针固定晶状体囊袋的方法，并在此方法的基础上进行了改进，将 8 根昆虫针减为 4 ~ 6 根，最大程度上保持囊袋的完整性，不易发生囊袋撕裂。

研究者采用 TGF-β 诱导 LECs 发生 EMT，其过程是模拟手术过程中的机械性刺激等外部因素导致机体产生 TGF-β 的方法，诱导 EMT 的发生，效果较好[27]。但本研究中未在培养液中加入 TGF-β，体外培养的 LECs 可通过自分泌作用产生内源性 TGF-β，从而诱导 EMT 的发生。本研究中不仅检测了囊袋模型中 α-SMA的表达，同时也检测了 E-cadherin 和 Vimentin 的表达，其表达趋势与 EMT 的发生过程一致，故认为此模型可以用来探讨 PCO 的发生机制。

本研究中制作的囊袋培养模型在保持晶状体囊袋形状的同时，尽可能保留了囊袋的完整性，其操作简单，可重复性好，该模型在培养过程中发生了第 2 代 LECs 的 EMT，可作为 PCO 发生机制研究的理想模型。

## 参考文献


[1] Clark DS. Posterior capsule opacification[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2000, 11(1): 56-64.

[2] Hosler MR, Wang-Su S-T, Wagner BJ. Role of the proteasesome in TGF-β signaling in lens epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(5): 2045-2052. DOI: 10.1167/iovs.05-0650.

[3] 刘冬梅，李俊红. MMPs 抑制剂 GM6001、MMP-2/9 抑制剂 Ⅰ 及 Ⅱ 对人晶状体上皮细胞移行的抑制作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(9): 811-815. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.009.
Liu DM, Li JH. Suppressing effects of MMPs inhibitor GM6001, MMP-2/9 inhibitor Ⅰ, MMP-2/9 inhibitor Ⅱ on migration of human lens epithelial cells[J]. Chin J Exp Opthmal, 2015, 33(9): 811-815. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.009.

[4] NibourgLM, GelensE, Kuijer R, et al. Prevention of posterior capsular opacification[J]. Exp Eye Res, 2015, 13(6): 100-115. DOI: 10.1016/j.exer.2015.03.011.

[5] Lee EH, Wan XH, Song J, et al. Lens epithelial cell death and reduction of anti-apoptoticprotein Bcl-2 in human anterior polar cataracts[J]. Mol Vis, 2002, 8: 235-240.

[6] Chen X, Xiao W, Chen W, et al. The epigenetic modifier trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and epithelial - mesenchymal transition of lens epithelial cells[J/OL]. Cell Death Dis, 2013, 4(10): e884[2016-01-06]. http://www.nature.com/cddis/journal/v4/n10/full/cddis2013416a.html. DOI: 10.1038/cddis.2013.416.

[7] Marcantonio JM, Syam PP, Liu CS, et al. Epithelial transdifferentiation and cataract in the human lens[J]. Exp Eye Res, 2003, 77(3): 339-346. DOI: 10.1016/S0014-4835(03) 00125-8.

[8] Wormstone IM. Posterior capsule opacification: a cell biological perspective[J]. Exp Eye Res, 2002, 74(3): 337-347. DOI: 10.1006/exer.2001.1153.

[9] Hales AM, Schulz MW, Chamberlain CG, et al. TGF-beta 1 induces lens cells to accumulate alpha-smooth muscle actin, a marker for subcapsular cataracts[J]. Curr Eye Res, 1994, 13(12): 885-890.

[10] Cleary G, Spalton DJ, Zhang JJ, et al. In vitro lens capsule model for investigation of posterior capsule opacification[J]. Cataract Refract Surg, 2010, 36(8): 1249-1252. DOI: 10.1016/j.jcrs.2010.05.006.

[11] Call MK, Grogg MW, del Rio-Tsonis K, et al. Lens regeneration in mice: implications in cataracts[J]. Exp Eye Res, 2004, 78(2): 297-299. DOI: 10.1016/j.exer.2003.10.021.

[12] Xiao W, Chen X, Li W, et al. Quantitative analysis of injury-induced anterior subcapsular cataract in the mouse: a model of lens epithelial cells proliferation and epithelial-mesenchymal transition[J/OL]. Sci Rep, 2015, 5: 8362[2016-01-09]. http://www.nature.com/articles/srep08362. DOI: 10.1038/srep08362.

[13] 韦琦，陈金卯，黄敏丽，等. 糖尿病兔晶状体后囊膜混浊模型的建立[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(2): 130-134. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.02.009.
Wei Q, Chen JM, Huang ML, et al. Establishment of model of diabetes and lens posterior capsule opacification induced by alloxan in rabbit[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(2): 130-134. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.02.009.

[14] Ibaraki N, Chen SC, Lin LR, et al. Human lens epithelial cell line[J]. Exp Eye Res, 1998, 67(5): 577-585. DOI: 10.1006/exer.1998.0551.

[15] Wehbe M, Soudja SM, Mas A, et al. Epithelial-mesenchymal-transition-like and TGF-beta pathways associated with autochthonous inflammatory melanoma development in mice[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(11): e49419[2015-12-25]. http://journals.plos.org/plosone/article? id=10.1371/journal.pone.0049419. DOI: 10.1371/journal.pone.0049 419.

[16] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Cli Invest, 2009, 119(6): 1420-1428. DOI: 10.1172/JCI39104.

[17] Liu J, Hales AM, Chamberlain CG, et al. Induction of cataract-like changes in rat lens epithelial explants by transforming growth factor beta[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(2): 388-401.

[18] Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW. Cataract induction in lenses cultured with transforming growth factor-beta[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(8): 1709-1713.

[19] Saika S, Miyamoto T, Ishida I, et al. TGFbeta-Smad signalling in postoperative human lens epithelial cells[J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86(12): 1428-1433. DOI: 10.1136/bjo.86.12.1428.

[20] Saika S, Kawashima Y, Miyamoto T, et al. Immunolocalization of prolyl 4-hydroxylase subunits, alpha-smooth muscle action, and extracellular matrix components in human lens capsules with lens implants[J]. Exp Eye Res, 1998, 66(3): 283-294. DOI: 10.1006/exer.1997.0434.

[21] Fan H, Zhao X, Sun S, et al. Function of focal adhesion kinase scaffolding to mediate endophilin A2 phosphorylation promotes epithelial-mesenchymal transition and mammary cancer stem cell activities in vivo[J]. J Biol Chem, 2013, 288(5): 3322-3333. DOI: 10.1074/jbc.M112.420497.

[22] Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition[J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 19): 4417-4422. DOI: 10.1242/jcs.099697.

[23] Saxby L, Rosen E, Boulton M. Lens epithelial cell proliferation, migration, and metaplasia following capsulorhexis[J]. Br J Ophthalmol, 1998, 82(8): 945-952. DOI: 10.1136/bjo.82.8.945.

[24] El-Osta AA, Spalton DJ, Marshall J. In vitro model for the study of human posterior capsule opacification[J]. J Cataract Refract Surg, 2003, 29(8): 1593-1600.

[25] Burger J, Kreutzer T, Alge CS, et al. Capsular tension ring-based in vitro capsule opacification model[J]. J Cataract Refract Surg, 2008, 34(7): 1167-1172. DOI: 10.1016/j.jcrs.2008.03.040.

[26] Liu CS, Wormstone IM, Duncan G, et al. A study of human lens cell


Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

growth in vitro. A model for posterior capsule opacification[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(5): 906-914.
[27] Wormstone IM, Anderson IK, Eldred JA, et al. Short-term exposure to transforming growth factor induces long-term fibrotic responses[J]. Exp Eye Res, 2006, 83(5): 1238-1245. DOI: 10.1016/j.exer.2006.06.013.

（收稿日期：2016-01-03）
（本文编辑：尹卫靖　杜娟）

· 病例报告 ·

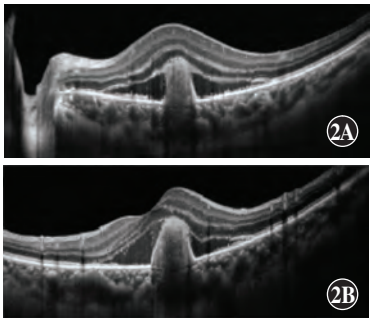
# 应用 OCT 血管成像技术随访雷珠单抗治疗特发性脉络膜新生血管一例

王林妮　李志清
300384 天津医科大学眼科医院　天津医科大学眼科研究所　天津医科大学眼视光学院
通信作者：李志清，Email：lzhqyk@163.com

DOI：10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.03.005

患者，男，34 岁，因左眼眼前圆形、黑斑状物遮挡 2 周就诊于天津医科大学眼科医院。眼部检查：右眼裸眼视力为 0.25，矫正视力 -5.25 D 至 1.00，眼压为 14 mmHg（1 mmHg = 0.133 kPa），眼前节和眼底检查未见明显异常。左眼裸眼视力为 0.10，矫正视力 -5.25 D 至 0.30，眼压为 15 mmHg，眼前节和玻璃体未见异常。间接检眼镜检查可见黄斑中心凹上方约 1/5 视盘直径（papillary diameter，PD）处类圆形黄白色病灶（图 1）。RTVue XR Avanti OCT（美国 Optovue 公司）检查可见左眼视网膜神经感觉层脱离，视网膜下积液，RPE 拱形隆起，其下方反射信号不均，隐见 Bruch 膜（图 2）。FFA 显示左眼早期视盘呈高荧光，黄斑区斑片状高荧光，随造影时间延长出现荧光素渗漏，FFA 晚期视盘荧光素渗漏，可见黄斑区呈边界模糊的局限性高荧光（图 3）。初步诊断：左眼特发性脉络膜新生血管（idiopathic choroidal neovascularization，ICNV）。建议患者左眼玻璃体腔注射雷珠单抗，但患者未进行相关治疗。初诊 1 周后复查，左眼裸眼视力为 0.03，BCVA 为 0.10。患者接受左眼玻璃体腔注射雷珠单抗 0.5 mg。注射后 3 d 左眼 BCVA 为 0.15，注射后 1 个月左眼 BCVA 为 0.50，OCT 示左眼视网膜下积液吸收，RPE 隆起减轻（图 4）。注射后 2 个月左眼裸眼视力为 0.02，BCVA 为 0.12，OCT 示左眼视网膜下积液再次出现（图 5），建议患者左眼玻璃体腔注射雷珠单抗，患者未接受治疗，给予球旁注射地塞米松 5 mg，每周 1 次，共 8 次，末次注射后复查发现视网膜下积液仍存在，OCT 血管成像（optical coherence tomography angiography，OCTA）示轮廓清晰的脉络膜新生血管（choroidal neovascularization，CNV）病灶（图 6）。患者左眼裸眼视力曾降至 0.01，BCVA 为 0.05，左眼再次行雷珠单抗？mg 玻璃体腔注射。此次注射后第 3 d 左眼 BCVA 为 0.06，OCT 示视网膜下积液吸收，OCTA 示 CNV 较前缩小（图 7）；注射后 1 个月左眼裸眼视力为 0.10，BCVA 为 0.50，OCT 示黄斑区病灶稳定（图 8）；注射后 4 个月左眼裸眼视力为 0.15，BCVA 为 0.60，自诉眼前黑斑样遮挡消失，轻度视物变形，OCT 及 OCTA 示病变稳定，患者仍处于定期随诊中（图 9 ~ 10）。

**讨论**：ICNV 是指患者年龄 50 岁以下、无明显的眼内炎或系统性疾病而发生的 CNV，常见症状包括视物模糊、视物变形和视野固定暗点等，自然病程及视力预后一般好于 AMD 继发 CNV[1-3]。传统的治疗方式多采用光动力疗法（photodynamic therapy，PDT），但可引起一过性缺血、RPE 损伤、VEGF 水平升高和 CNV 复发。因 ICNV 与湿性 AMD 的病理基础均为黄斑区 CNV 及其出血、渗出及纤维瘢痕形成，且病变发展与 VEGF 的高表达有关，所以抗 VEGF 也被应用于 ICNV 的治疗，视力的提高程度要优于 PDT[4-6]。Shi 等[7]观察经雷珠单抗玻璃体腔注射的 19 例 ICNV 患者并与 18 例行 PDT 的 ICNV 患者进行比较，发现雷珠单抗治疗组疗效优于 PDT 组，与 Kang 等[8]的研究结果相似。Fan 等[9]通过对比早期（病程≤3 个月）和中期（病程 3 至 6 个月）的 ICNV 患者经雷珠单抗玻璃体腔注射后的 BCVA 及 OCT 特点，发现雷珠单抗注射早期视力提高更明显，黄斑中心厚度降低和注药次数减少。本例患者发病后 3 周即行玻璃体腔注射雷珠单抗，视网膜下积液较快吸收且视力提高明显，但仍未恢复发



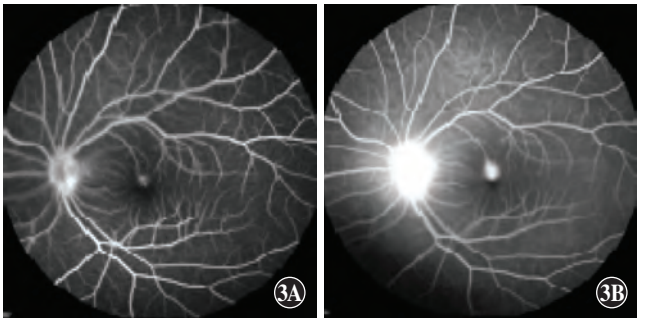




**图 1　治疗前左眼眼底照相**　可见黄斑中心凹上方类圆形、黄白色病灶，大小约 1/5 PD　**图 2　治疗前患者左眼 OCT 表现**　显示视网膜神经感觉层隆起，视网膜下可见低反射液性暗区，RPE 隆起，其下方反射信号不均，隐见 Bruch 膜　A：水平扫描　B：垂直扫描　**图 3　治疗前患者左眼 FFA 检查**　A：注射造影剂 00:36′时可见视盘高荧光，黄斑区斑片状高荧光　B：10:31′时可见视盘荧光素渗漏，黄斑区有局限性高荧光

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?