

胸腺素 $\beta 4$ 对乙醇诱导的体外兔角膜上皮细胞损伤的保护作用

姜志昕 郝朋 汤欣 李轩

300020 天津市眼科医院 天津市眼科学与视觉科学重点实验室 天津市眼科研究所 天津医科大学眼科临床学院

通信作者:李轩, Email: xuanli08@yahoo.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.003

【摘要】 背景 准分子激光角膜上皮瓣下磨镶术(LASEK)是目前主要的屈光矫正术式之一,但术中使用的乙醇可引起角膜上皮的损伤。胸腺素 $\beta 4$ (T $\beta 4$)具有抗凋亡等多种生物学作用,但其对乙醇所致的角膜上皮细胞损伤是否具有保护作用尚不清楚。目的 研究 T $\beta 4$ 对乙醇诱导的角膜上皮细胞损伤是否具有预防作用。方法 收集 10 只健康成年新西兰白兔的角膜,采用组织块培养法获得兔原代角膜上皮细胞传代,逆转录 PCR(RT-PCR)法检测缝隙连接蛋白 connexin 43 和成熟角蛋白 keratin 12 的表达情况,对细胞进行鉴定。选取第 2 代处于对数生长期的细胞均分为 4 个组,正常对照组细胞进行常规培养, T $\beta 4$ 组细胞在培养液中添加终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 T $\beta 4$,乙醇组细胞用含体积分数 20% 乙醇的 PBS 作用 20 s 以制备角膜上皮细胞损伤模型,乙醇+T $\beta 4$ 组在损伤模型培养液中加入 T $\beta 4$ 。采用 MTT 法检测各组角膜上皮细胞存活率;采用 TUNEL 法观察角膜上皮细胞的凋亡情况;采用实时荧光定量 PCR 法检测各组角膜上皮细胞中细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)和细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)mRNA 的相对表达量;应用 ELISA 法检测各组角膜上皮细胞中 bcl-2 蛋白的质量浓度;用分光光度法检测细胞裂解液中 caspase-3 酶活性。结果 MTT 法结果显示,正常对照组细胞存活率设定为 100%,乙醇组细胞存活率为(52.1 \pm 14.07)%,明显低于正常对照组,差异有统计学意义($P=0.001$);乙醇+T $\beta 4$ 组细胞存活率为(77.7 \pm 19.60)%,明显高于乙醇组,差异有统计学意义($P=0.035$)。TUNEL 染色显示,乙醇组和乙醇+T $\beta 4$ 组均可见明显的 TUNEL 阳性染色细胞,乙醇+T $\beta 4$ 组阳性细胞百分比为(30.0 \pm 6.7)%,明显低于乙醇组的(42.4 \pm 4.0)%,差异有统计学意义($P=0.01$)。实时定量 PCR 显示,乙醇+T $\beta 4$ 组细胞中 Cyclin D1 mRNA 和 CDK4 mRNA 的相对表达量分别为 0.93 \pm 0.17 和 0.88 \pm 0.09,均明显高于乙醇组的 0.68 \pm 0.05 和 0.54 \pm 0.07,差异均有统计学意义($P=0.027/0.002$)。ELISA 显示,乙醇组细胞中 bcl-2 蛋白质量浓度明显低于乙醇+T $\beta 4$ 组,而 caspase-3 酶活性则高于乙醇+T $\beta 4$ 组,差异均有统计学意义($P=0.030/0.021$)。结论 T $\beta 4$ 对乙醇诱导的角膜上皮细胞损伤具有保护作用,其作用机制可能是通过降低角膜上皮细胞中 caspase-3 酶活性和增加 bcl-2 蛋白质量浓度来阻止乙醇所致的细胞凋亡;T $\beta 4$ 也可上调角膜上皮细胞中 Cyclin D1 及 CDK 4 的表达,以调控细胞分裂和增生,促进角膜上皮损伤的愈合。

【关键词】 角膜上皮/药物影响;乙醇相关异常;胸腺素;细胞生存/药物影响;凋亡/药物影响;细胞培养;动物,兔

基金项目: 国家自然科学基金项目(81170828);天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(15JCZDJC35300);天津市卫生行业重点攻关项目(14KG133)

Protective effects of thymosin $\beta 4$ on ethanol-induced rabbit corneal epithelial cell damage *in vitro* Jiang Zhixin, Hao Peng, Tang Xin, Li Xuan

Tianjin Eye Hospital, Tianjin Key Laboratory of Ophthalmology and Vision Science, Tianjin Eye Institute, Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Li Xuan, Email: xuanli08@yahoo.com

[Abstract] **Background** Laser assisted subepithelial keratomileusis (LASEK) is one of surgical procedures for refractive correction. Dilute alcohol that is used for the removal of epithelium during LASEK induces the apoptosis of corneal epithelial cells. Researches showed that thymosin $\beta 4$ (T $\beta 4$) can arrest apoptosis, but whether T $\beta 4$ plays

inhibitory effect on ethanol-induced damage of corneal epithelial cells is still unelucidated. **Objective** The aim of this study was to investigate the protective effects of T β 4 on ethanol-induced rabbit corneal epithelial cell damage *in vitro*. **Methods** The corneal tissue of deendothelium was obtained from 10 New Zealand white rabbits. Corneal epithelial cells were cultured *in vitro* by using explant culture method. Cultured cells were identified by detecting the expression of keratin 12 and connexin 43 with reverse transcription PCR (RT-PCR). The cells of second generation were collected and divided into 4 groups. The cells were regularly cultured in the normal control group, and T β 4 was added in the culture medium at the final concentration of 1 μ g/ml in the T β 4 treated group. Ethanol-induced rabbit corneal epithelial cell damage models were established by adding PBS containing 20% alcohol in medium for 20 seconds in the model group, and T β 4 was added in the medium of model cells at the final concentration of 1 μ g/ml in the model+T β 4 group. The survival rate of the cells was detected by MTT assay, and the apoptosis rate of the cells was examined by TUNEL method. The relative expression levels of cyclin D1 mRNA and cyclin-dependent protein kinase 4 (CDK4) mRNA in the cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The content of bcl-2 protein in the cells was detected by ELISA assay. Spectrophotometry was employed to measure the activity of caspase-3. The study complied with the Regulation for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** The mean cell survival rate was (52.1 \pm 14.07)% in the model group, which was significantly reduced in comparison with 100% of the normal control group and (77.7 \pm 19.60)% of the model+T β 4 group ($P=0.001, P=0.035$). TUNEL staining revealed more positive cells in the model group and the model+T β 4 group, and the percentage of TUNEL positive cells was (30.0 \pm 6.7)% in the model+T β 4 group, showing an evident decline in comparison with (42.4 \pm 4.0)% of the model group ($P=0.01$). The relative expression levels of cyclin D1 mRNA and CDK4 mRNA were 0.93 \pm 0.17 and 0.88 \pm 0.09 in the model+T β 4 group, which were significantly higher than 0.68 \pm 0.05 and 0.54 \pm 0.07 in the model group ($P=0.027, 0.002$). ELISA assay exhibited that bcl-2 content in the cells was considerably lower, and caspase-3 activity was significantly higher in the model group than those in the model+T β 4 group ($P=0.030, 0.021$). **Conclusions** T β 4 plays a protective effect on rabbit corneal epithelial cells from apoptosis by lowering the caspase 3 activity and increasing bcl-2 content in ethanol-damaged rabbit corneal epithelial cells. In addition, T β 4 promotes the regrowth of corneal epithelial cells by up-regulating the expression of cyclin D1 and CDK4.

[Key words] Epithelium, corneal/drug effects; Alcohol-related disorders; Thymosin; Cell survival/drug effects; Apoptosis/drug effects; Cells, cultured; Animal, rabbits

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81170828); Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (15JCZDJC35300); Tianjin Health Industry Key Research Projects (14KG133)

准分子激光角膜屈光手术是目前屈光矫正常见的术式之一。与准分子激光角膜切削术 (photorefractive keratectomy, PRK) 相比较, 准分子激光角膜上皮瓣下磨镶术 (laser assisted subepithelial keratectomileusis, LASEK) 术后视力恢复快且能保持稳定, 术眼疼痛感轻; 此外, LASEK 术中和术后角膜瓣的相关并发症较准分子激光原位角膜磨镶术 (laser assisted in-situ keratomileusis, LASIK) 少, 且角膜较薄者能够最大限度地保留一定的角膜基质厚度, 因此目前 LASEK 在近视矫正手术中应用较为广泛^[1-2]。但 LASEK 术中乙醇对角膜上皮细胞具有潜在的毒性作用。研究表明, 乙醇可引起细胞凋亡, 降低细胞活性, 而角膜上皮细胞活性受损、角膜上皮延迟愈合是影响术后视力的重要因素, 受损角膜上皮细胞释放的细胞因子可以诱导级联反应, 并作用于角膜基质细胞, 导致角膜 haze 的发生

和瘢痕的形成^[3-5]。因此保护角膜上皮细胞免受损伤, 是减少术后并发症的有效方法。胸腺素 β 4 (thymosin β 4, T β 4) 是由 43 个氨基酸残基组成的、高度保守的水溶性多肽, 是胸腺素 β 家族中分布最广, 含量最多的一员, 具有多种生物学功能, 如调节肌动蛋白、促进细胞迁移、调控炎症反应、抑制细胞凋亡、促进皮肤损伤愈合等作用^[6-9]。我们前期的研究表明, T β 4 可阻止氧化应激损伤所致的角膜上皮细胞的凋亡, 但 T β 4 对于乙醇所致的角膜上皮细胞损伤、凋亡的作用及机制尚未完全明了^[10]。本研究拟探讨 T β 4 对乙醇诱导的角膜上皮细胞凋亡的保护作用及其机制为 T β 4 用于 LASEK 术后角膜上皮损伤的预防和治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级成年新西兰大白兔 10 只(天津医科大学实验动物中心),雌雄兼用,体质量 2.0~2.5 kg。所有动物眼部屈光间质透明,无眼前节病变。实验动物的使用和喂养遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、T β 4(美国 Gibco 公司);质量分数 0.25% 胰蛋白酶(含质量分数 0.02% EDTA)(美国 Biotopped 公司);四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国 Sigma 公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);MMLV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶(美国 Promega 公司);SYBR Premix Ex Taq I(日本 Takara 公司);TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);ELISA 试剂盒(上海恒远生物科技发展有限公司)。CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司);倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);Realplex2 荧光定量 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔角膜上皮细胞的分离培养 空气栓塞法处死实验兔后立即摘取眼球,去除眼周组织,PBS 反复冲洗后,置于含 1 000 U/ml(商品单位)青链霉素的 PBS 液中浸泡 15 min,操作在无菌条件下实施,显微镜下沿角膜缘环形剪下角膜片,撕除内皮层,将角膜片剪成 6~8 块,将去除基质层的组织块平铺于培养皿中,采用组织块培养法进行培养。参照文献[10]的方法配制 SHEM 培养液:DMEM/F12 培养液中添加 FBS、DMSO、10 ng/ml 上皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、0.5 μ g/ml Hydrocortisone、10 mol/L Cholera toxin A、50 μ g/ml 庆大霉素、1.25 μ g/ml 两性霉素。培养 3~4 d 后细胞达 50%~60% 融合时取出角膜片,继续培养至细胞达 80%~90% 单层融合时,0.25% 胰蛋白酶进行消化和传代。

1.2.2 逆转录 PCR 检测 connexin 43 和 keratin 12 的表达 收集第 2 代兔角膜上皮细胞,按照 Trizol 试剂说明书提取细胞总 mRNA,紫外分光光度计检测其纯度和浓度,并进行逆转录获取 cDNA。以 GAPDH 作为内参基因。大连宝生物有限公司设计并合成引物。Connexin 43 上游引物为 5'-CAGAACAAAACCGAATGGGG-3',下游引物为 5'-TATCTCTAGGTCATCAGCCG-3',扩增长度为 203 bp。Keratin 12 上游引物为 5'-AGCTGGAGATAGACCTAC-3',下游引物为 5'-GAACTTGGGATGATACCACC-3',扩增长度为 195 bp。

反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 25 个循环;然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 10 μ l PCR 产物经质量分数 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后成像观察。

1.2.3 实验分组 取第 2 代处于对数生长期的角膜上皮细胞进行无血清的 DMEM/F12 培养液孵育。细胞分为 4 个组,正常对照组进行常规培养,T β 4 组添加终浓度为 1 μ g/ml 的 T β 4,乙醇组用含体积分数 20% 乙醇的 PBS 作用 20 s 后吸弃培养液,PBS 洗 2 遍后加入培养液,乙醇+T β 4 组细胞用含 20% 乙醇的 PBS 作用 20 s 后,用 PBS 洗 2 遍,加入含有终浓度为 1 μ g/ml T β 4 的培养液。各组继续培养 24 h 后用于后续实验。

1.2.4 MTT 法检测各组角膜上皮细胞存活率 取对数生长期角膜上皮细胞,按照 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中,每孔加入含 10% FBS DMEM/F12 培养液 100 μ l,于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,培养后 24 h 可见细胞单层铺满孔板,饥饿处理过夜后,弃培养液。各组细胞分别给予相应的处理,每组设 5 个复孔。培养后 24 h 取出 96 孔板,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ l,孵育 4 h,弃去培养液,每孔加 DMSO 150 μ l,振荡 10 min,直至完全溶解。DMSO 调零后,酶标仪在波长 490 nm 处测各孔吸光度(A_{490})值,计算细胞存活率。实验组细胞存活率 = 实验组 A 值/正常对照组 A 值 $\times 100\%$ 。每组 5 个复孔,取其平均值,实验重复 3 次。

1.2.5 TUNEL 法检测各组细胞凋亡率 以 2×10^4 /孔的密度将角膜上皮细胞接种于预先放置载玻片的 24 孔板中培养,每组设 3 个复孔,24 h 后经过饥饿处理后,根据分组分别给予相应处理,将各组制作成细胞爬片。室温下质量分数 4% 多聚甲醛固定 1 h,体积分数 70% 乙醇水合过夜,用含体积分数 0.1% TritonX-100 和质量分数 0.1% 枸橼酸钠的溶液于冰上通透 2 min,加封闭液后室温处理 30 min。按 TUNEL 检测试剂盒说明书配制 TUNEL 反应混合物,滴加在载玻片上,37 $^{\circ}$ C 湿盒内避光孵育 2 h,PBS 洗后滴加 streptavidin-HRP 工作液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木精复染,甘油明胶封片。以 PBS 作为阴性对照,以 DNase I 消化的细胞作为阳性对照。光学显微镜下观察细胞形态。细胞核呈棕黄色或棕褐色为染色阳性,任意选取 5 个视野计数阳性细胞。阳性细胞率 = 阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测细胞中细胞周期蛋白 D1 和细胞周期蛋白依赖性激酶 4 基因的相对表达量

分别收集各组角膜上皮细胞, Trizol 法提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, -20 °C 保存。根据 Genebank 中细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 和细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin-dependent protein kinase 4, CDK4) 的序列设计相关引物(表 1)。反应体系为: 10 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μl, SYBR Green I 10 μl、无菌去离子水 8 μl、cDNA 模板 1 μl, 共 20 μl。在荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 反应条件为: 95 °C 预变性 15 s; 95 °C 变性 15 s, 57 °C 退火 30 s, 74 °C 延伸 30 s, 共 45 个循环。融解曲线分析: 95 °C 反应 15 s, 60 °C 反应 30 s, 95 °C 反应 15 s, 最后 4 °C 直至结束。每组 3 个复孔, 实验重复 3 次。以 GAPDH 基因作为内参, 应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的相对表达量。

表 1 相关引物序列

引物名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
GAPDH	CCACTTTGTGAAGCTCATTTCCT	TCGTCTCTCTGGTGTCTCT
Cyclin D1	TTGTCTCAAAGCCTGCCAGG	TTGGTCCAGTTCATCTCCG
CDK4	GGAAATGCTGACTTTCAGCC	CTTCCTGTGGAGGTAAGAG

注: Cyclin: 细胞周期蛋白; CDK: 细胞周期蛋白依赖激酶

1.2.7 ELISA 法检测各组细胞中 bcl-2 蛋白相对表达量 取第 2 代角膜上皮细胞铺于直径为 6 cm 的培养皿中, 培养 24 h 至细胞融合状态, 饥饿处理后各组细胞分别给予相应处理, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h, 弃培养液, PBS 漂洗后, 刮取细胞, 500 μl PBS 充分混匀, 吸入匀浆器内, 冰上充分研磨后, 将混合液吸出, 离心半径为 10 cm, 1 000 r/min 离心 15 min, 取上清液行 bcl-2 ELISA 检测。制作标准曲线, 根据样品的 A 值计算出对应的样品浓度。实验重复 3 次。

1.2.8 分光光度法检测各组细胞中 caspase-3 酶的活性 采用 1.2.6 方法制备细胞裂解液, 运用 caspase-3 特异水解多肽底物 acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA), 释放硝基苯胺 pNA, 检测 caspase-3 活性。caspase-3 活性 = 实验组 A 值/正常对照组 A 值^[11]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。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, 组间方差经 Levene 检验显示方差齐。采用均衡分组四水平实验设计, 正常对照组、Tβ4 组、乙醇组和乙醇+Tβ4 组间角膜上皮细胞的存活率和细胞中 Cyclin D1 mRNA 和 CDK4 mRNA 的相对表达量、细胞中 bcl-2 蛋白质量浓度以及细胞中 caspase-3 酶活性的

总体比较均采用单因素方差分析, 组间多重比较均采用 LSD-t 检验。乙醇组和乙醇+Tβ4 组间细胞凋亡率的差异比较采用独立样本 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔角膜上皮细胞的形态及鉴定

培养 24 h 后可见角膜上皮细胞从组织块周围迁出(图 1A)。培养 48 h 后可见细胞呈卵圆形或多边形, 细胞核大, 细胞镶嵌排列, 呈铺路石样生长(图 1B)。RT-PCR 检测显示, 第 2 代兔角膜上皮细胞中 connexin 43 和 keratin 12 均有阳性表达, 兔角膜基质细胞呈阴性表达(图 2)。

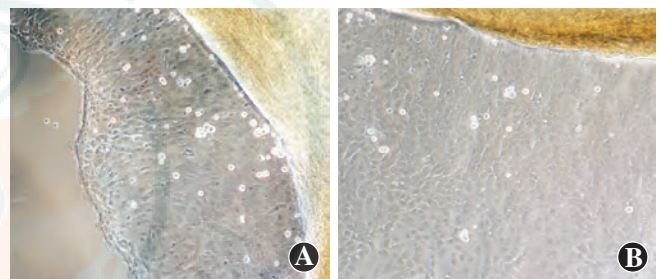


图 1 倒置显微镜下培养细胞的形态学观察(×100) A: 组织块法培养 24 h 后可见细胞迁出 B: 培养 48 h 后细胞呈铺路石样生长

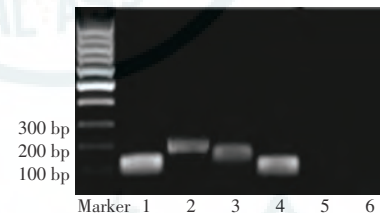


图 2 角膜上皮细胞和基质细胞中 connexin 43 和 keratin 12 表达 1: 上皮细胞中 GAPDH 表达 2: 上皮细胞中 connexin 43 表达 3: 上皮细胞中 keratin 12 表达 4: 基质细胞中 GAPDH 表达 5: 基质细胞中 connexin 43 表达 6: 基质细胞中 keratin 12 表达

2.2 各组细胞角膜上皮细胞存活率的变化

MTT 法检测显示, 正常对照组、Tβ4 组、乙醇组和乙醇+Tβ4 组角膜上皮细胞的存活率分别为 (100.00 ± 7.94)%、(102.00 ± 5.48)%、(52.10 ± 14.04)% 和 (77.70 ± 10.62)% , 4 个组间细胞存活率的总体比较差异有统计学意义 (F = 10.685, P = 0.004)。乙醇组细胞存活率明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 (P = 0.001), 乙醇+Tβ4 组细胞存活率明显高于乙醇组, 差异有统计学意义 (P = 0.035)(图 3)。

2.3 各组角膜上皮细胞凋亡的比较

正常对照组和 Tβ4 组角膜上皮细胞中均未见明显的阳性染色, 乙醇组和乙醇+Tβ4 组均可见明显的 TUNEL 阳性染色细胞, 但乙醇+Tβ4 组阳性染色细胞

明显少于乙醇组(图 4)。乙醇组 TUNEL 阳性染色细胞率为 $(42.4 \pm 4.0)\%$, 乙醇 + T β 4 组为 $(30.0 \pm 6.7)\%$, 乙醇 + T β 4 组阳性染色细胞率明显低于乙醇组, 差异有统计学意义 ($P=0.01$)。

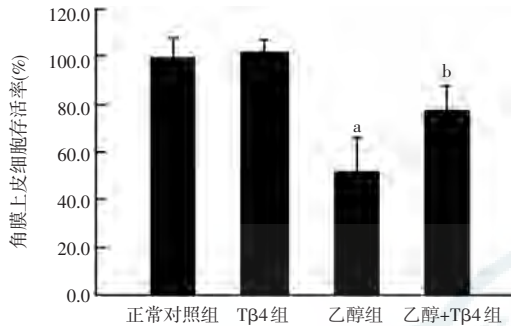


图 3 各组角膜上皮细胞存活率的比较 $F=10.685, P=0.004$ 。与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与乙醇组比较, ^b $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) T β : 胸腺素 β

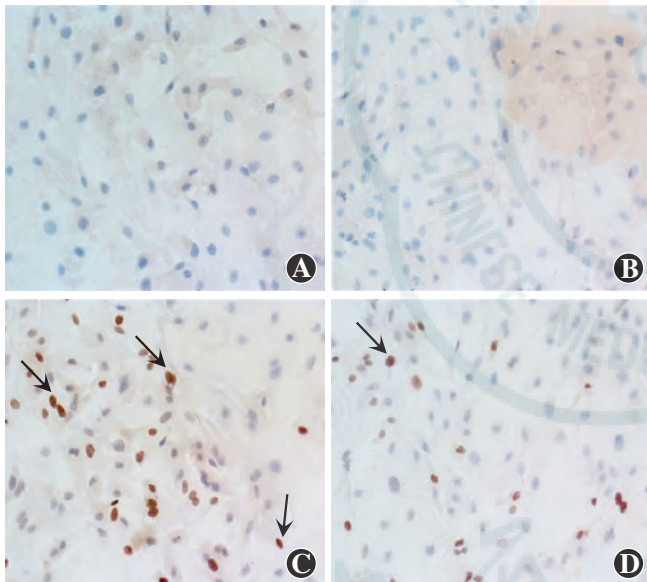


图 4 TUNEL 染色检测各组角膜上皮细胞的凋亡 (DAB $\times 200$) A: 正常对照组未见 TUNEL 染色阳性细胞 B: T β 4 组未见 TUNEL 染色阳性细胞 C: 乙醇组可见较多的 TUNEL 染色阳性细胞 (箭头) D: 乙醇+T β 4 组 TUNEL 染色阳性细胞 (箭头) 明显少于乙醇组

2.4 各组细胞 Cyclin D1 和 CDK4 mRNA 相对表达量的比较

实时荧光定量 PCR 检测显示, 各组 Cyclin D1 mRNA 和 CDK4 mRNA 的相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F=39.537, P<0.01; F=14.898, P<0.01$)。与正常对照组比较, 乙醇组 Cyclin D1 mRNA 和 CDK4 mRNA 的相对表达量分别降低 32% 和 46%, 2 个组 Cyclin D1 mRNA 和 CDK4 mRNA 的相对表达量差异有统计学意义 ($P=0.009, 0.000$); 与乙醇组比较, 乙醇+T β 4 组角膜上皮细胞中 Cyclin D1 mRNA 及

CDK4 mRNA 的相对表达量均明显上调, 差异有统计学意义 ($P=0.027, 0.002$) (表 2)。

表 2 各组 Cyclin D1 及 CDK4 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Cyclin D1 mRNA	CDK4 mRNA
正常对照组	3	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
T β 4 组	3	1.66 \pm 0.14	0.91 \pm 0.14
乙醇组	3	0.68 \pm 0.05 ^a	0.54 \pm 0.07 ^a
乙醇+T β 4 组	3	0.93 \pm 0.17 ^b	0.88 \pm 0.09 ^b
<i>F</i>		39.537	14.898
<i>P</i>		<0.01	<0.01

注: 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与乙醇组比较, ^b $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) Cyclin: 细胞周期蛋白; CDK: 细胞周期蛋白依赖性激酶; T β : 胸腺素 β

2.5 各组细胞中 caspase-3 酶活性和 bcl-2 蛋白表达的变化

正常对照组、T β 4 组、乙醇组和乙醇+T β 4 组间角膜上皮细胞中 caspase-3 酶活性及 bcl-2 蛋白表达水平的总体比较差异有统计学意义 ($F=6.111, P=0.023; F=3.963, P=0.029$)。与正常对照组比较, 乙醇组细胞中 caspase-3 酶的活性明显增加, bcl-2 蛋白表达水平明显降低, 差异均有统计学意义 ($P=0.008, 0.021$); 与乙醇组比较, 乙醇+T β 4 组细胞内 caspase-3 酶的活性显著降低, 而细胞内 bcl-2 蛋白表达水平明显增加, 差异均有统计学意义 ($P=0.021, 0.030$) (表 3)。

表 3 各组细胞中 caspase-3 活性及 bcl-2 蛋白质量浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Caspase-3 活性	Bcl-2 (ng/ml)
正常对照组	3	1.00 \pm 0.00 ^a	2.60 \pm 0.39 ^a
T β 4 组	3	0.98 \pm 0.19	2.74 \pm 0.15
乙醇组	3	1.30 \pm 0.03	2.09 \pm 0.08
乙醇+T β 4 组	3	1.06 \pm 0.13 ^a	2.50 \pm 0.45 ^a
<i>F</i>		6.111	3.963
<i>P</i>		0.023	0.029

注: 与乙醇组比较, ^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) T β : 胸腺素 β

3 讨论

LASEK 术制作的角膜上皮瓣中细胞的成活率对术后角膜功能恢复极其关键^[12]。角膜上皮损伤, 特别是角膜上皮基底膜的破坏可诱导损伤细胞合成并分泌相关的细胞因子, 进一步导致角膜基质细胞的凋亡、激活和纤维化反应, 从而引起角膜混浊^[13]。研究发现, LASEK 术后角膜上皮细胞的凋亡和 haze 的发生与术中使用乙醇有关, 且术中乙醇接触角膜上皮的时间以

及乙醇的浓度是 2 个重要因素,浸润角膜上皮的乙醇体积分数不应超过 20%,浸润时间不应超过 40 s^[12,14-15]。临床中 20% 乙醇松解上皮 20 s 效果较好,因此本研究中采用 20% 乙醇作用于体外培养的兔角膜上皮细胞 20 s 来建立兔角膜上皮损伤模型。本研究表明,乙醇处理后角膜上皮细胞存活率明显下降,而 Tβ4 可显著抑制乙醇对角膜上皮细胞的损伤作用。实时荧光定量 PCR 检测发现,乙醇作用后角膜上皮细胞中 Cyclin D1 mRNA 和 CDK4 mRNA 的表达量下调,而添加 Tβ4 后其表达量明显升高,提示 Tβ4 可通过上调 Cyclin D1、CDK4 的表达来调控角膜上皮细胞的分裂和增生,从而促进角膜上皮损伤的愈合,这与其他关于 Tβ4 促进成熟前期神经少突胶质细胞的增生及神经损伤愈合的研究结果一致^[16]。

研究表明,乙醇可诱导角膜上皮细胞发生凋亡^[15,17]。本研究中也发现乙醇作用于体外培养的角膜上皮细胞后凋亡细胞较正常对照组和 Tβ4 组明显增多,乙醇+Tβ4 组中凋亡细胞则明显少于乙醇组。Caspase 酶是凋亡过程中重要的终末剪切酶,在调节及执行细胞凋亡过程中发挥核心作用^[18]。本研究结果显示乙醇组的角膜上皮细胞中 caspase-3 酶活性增高,乙醇+Tβ4 组角膜上皮细胞中 caspase-3 酶活性明显降低。此外,bcl-2 是重要的凋亡抑制蛋白,其高表达导致细胞核内氧化还原的平衡状态发生改变,从而降低 caspase-3 酶的活性,阻止凋亡诱导因子和细胞色素 C 在线粒体的释放,抑制细胞凋亡^[19]。本研究结果显示,乙醇组 bcl-2 蛋白的表达水平明显下降,而乙醇+Tβ4 组 bcl-2 蛋白表达较乙醇组明显增加,表明 Tβ4 具有抑制细胞凋亡的作用,可能与上调细胞中 bcl-2 表达及抑制 caspase-3 酶活性有关。

综上所述,Tβ4 对乙醇所致的角膜上皮细胞损伤具有保护作用,其作用机制可能与增加角膜上皮细胞中 bcl-2 的表达及抑制 caspase-3 活性,从而阻止细胞凋亡有关。Tβ4 还可上调细胞中 Cyclin D1 和 CDK4 的表达,从而调控细胞分裂和增生,促进损伤愈合。本研究为临床上 Tβ4 治疗角膜损伤的应用研究提供了依据。

参考文献

- [1] Kulkarni SV, AlMahmoud T, Priest D, et al. Long-term visual and refractive outcomes following surface ablation techniques in a large population for myopia correction[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(1): 609-619. DOI: 10.1167/iovs.12-10387.
- [2] Kornilovsky IM. Clinical results after subepithelial photorefractive keratectomy (LASEK)[J]. J Refract Surg, 2001, 17(2 Suppl): 222-223.
- [3] Hicks SD, Lewis L, Ritchie J, et al. Evaluation of cell proliferation, apoptosis, and DNA-repair genes as potential biomarkers for ethanol-induced CNS alterations[J/OL]. BMC Neurosci, 2012, 13: 128 [2015-09-23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3519626/>. DOI: 10.1186/1471-2202-13-128.
- [4] Angunawela RI, Winkler von Mohrenfels C, Kumar A, et al. Live or let die: epithelial flap vitality and keratocyte proliferation following LASEK and Epi-LASIK in human donor and porcine eyes[J]. J Refract Surg, 2011, 27(2): 111-118. DOI: 10.3928/1081597X-20100330-01.
- [5] Einollahi B, Baradaran-Rafii A, Rezaei-Kanavi M, et al. Mechanical versus alcohol-assisted epithelial debridement during photorefractive keratectomy: a confocal microscopic clinical trial[J]. J Refract Surg, 2011, 27(12): 887-893. DOI: 10.3928/1081597X-20110823-02.
- [6] Nemolato S, Ekstrom J, Cabras T, et al. Immunoreactivity for thymosin beta 4 and thymosin beta 10 in the adult rat oro-gastro-intestinal tract[J/OL]. Eur J Histochem, 2013, 57(2): e17 [2015-09-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23807296/>. DOI: 10.4081/ejh.2013.e17.
- [7] Treadwell T, Kleinman HK, Crockford D, et al. The regenerative peptide thymosin β4 accelerates the rate of dermal healing in preclinical animal models and in patients[J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1270: 37-44. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06717.x.
- [8] Selmi A, Malinowski M, Brutkowski W, et al. Thymosin β4 promotes the migration of endothelial cells without intracellular Ca²⁺ elevation[J]. Exp Cell Res, 2012, 318(14): 1659-1666. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.04.009.
- [9] Bollini S, Riley PR, Smart N. Thymosin β4: multiple functions in protection, repair and regeneration of the mammalian heart[J]. Expert Opin Biol Ther. 2015, 15 Suppl 1: S163-174. DOI: 10.1517/14712598.2015.1022526.
- [10] 李轩, 姜志昕, 郝朋, 等. 胸腺素 β4 对外培养的兔角膜上皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中华眼科杂志, 2013, 49(8): 716-722. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2013.08.010.
- [11] Li X, Jiang ZX, Hao P, et al. Protective effect of thymosin β4 against oxidative damage in cultured rabbit corneal epithelial cells[J]. Chin J Ophthalmol, 2013, 49(8): 716-722.
- [12] Jia Y, Li Y, Du S, et al. Involvement of MsrB1 in the regulation of redox balance and inhibition of peroxynitrite-induced apoptosis in human lens epithelial cells[J]. Exp Eye Res, 2012, 100: 7-16. DOI: 10.1016/j.exer.2012.04.008.
- [13] Javier JA, Lee JB, Oliveira HB, et al. Basement membrane and collagen deposition after laser subepithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy in the leghorn chick eye[J]. Arch Ophthalmol, 2006, 124(5): 703-9. DOI: 10.1001/archophth.124.5.703.
- [14] Torricelli AA, Singh V, Agrawal V, et al. Transmission electron microscopy analysis of epithelial basement membrane repair in rabbit corneas with haze[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(6): 4026-33. DOI: 10.1167/iovs.13-12106.
- [15] Taneri S, Zieske JD, Azar DT. Evolution, techniques, clinical outcomes, and pathophysiology of LASEK: review of the literature[J]. Surv Ophthalmol, 2004, 49(6): 576-602. DOI: 10.1016/j.survophthal.2004.08.003.
- [16] Chen CC, Chang JH, Lee JB, et al. Human corneal epithelial cell viability and morphology after dilute alcohol exposure[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(8): 2593-2602.
- [17] Zhang J, Zhang ZG, Morris D, et al. Neurological functional recovery after thymosin beta4 treatment in mice with experimental autoencephalomyelitis[J]. Neuroscience, 2009, 164(4): 1887-1893. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.09.054.
- [18] Oh JY, Yu JM, Ko JH. Analysis of ethanol effects on corneal epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(6): 3852-3856. DOI: 10.1167/iovs.13-11717.
- [19] Yamaguchi M. The anti-apoptotic effect of regucalcin is mediated

through multisignaling pathways[J]. Apoptosis, 2013, 18(10): 1145-1153. DOI: 10. 1007/s 10495-013-0859-x.

10. 1016/j. jss. 2009. 04. 013.

[19] Girix M, Sc M, Erbil Y, et al. Heme oxygenase-1 prevents hyperthyroidism induced hepatic damage via an antioxidant and antiapoptotic pathway[J]. J Surgical Res, 2009, 4(13): 1-10. DOI:

(收稿日期: 2015-10-09)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)

· 病例报告 ·

有外层视网膜管状结构的 AMD 患者抗 VEGF 治疗评价一例

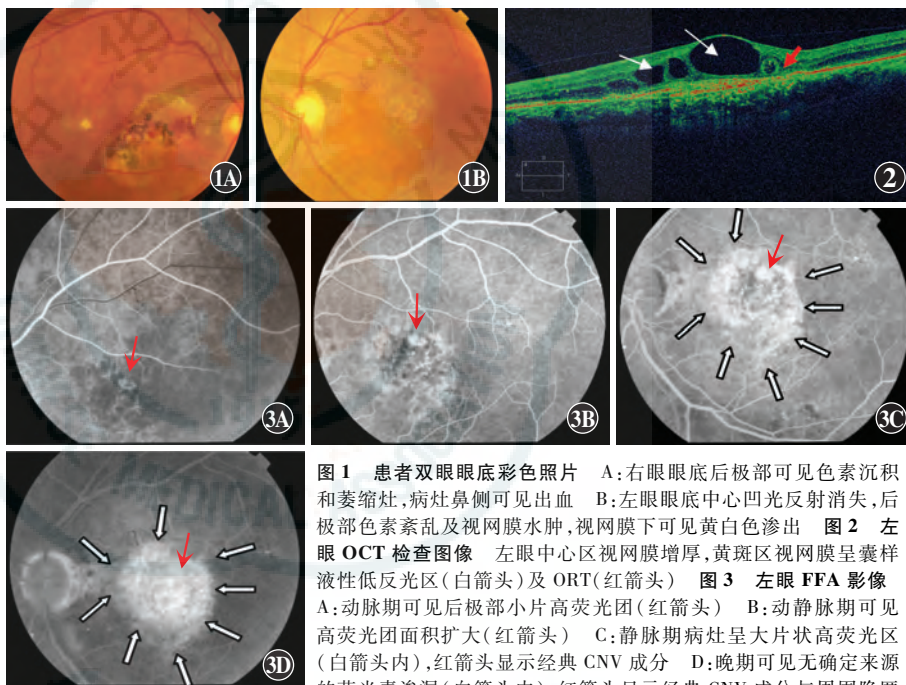
马雅贞 袁源智

200032 上海, 复旦大学附属中山医院眼科

通信作者: 袁源智, Email: yuan.yuanzhi@zs-hospital.sh.cn

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 02. 004

患者, 男, 72 岁。因左眼视物不清 1 年并加重 2 个月于 2013 年 12 月 12 日来诊, 患者诉右眼视物不清 10 余年, 既往高血压病史 10 余年, 药物治疗后血压正常; 2 年前曾患脑血管梗塞。眼科检查: 按照早期治疗糖尿病视网膜病变研究 (early treatment diabetic retinopathy study, ETDRS) 视力表, 右眼最佳矫正视力 (best corrected visual acuity, BCVA) 为 49 个字母, 左眼为 41 个字母; 右眼眼压 16 mmHg (1 mmHg = 0. 133 kPa), 左眼 19 mmHg。裂隙灯显微镜检查双眼前节和玻璃体均未发现异常, 晶状体轻度混浊。右眼眼底后极部可见大片色素沉积和萎缩灶, 病灶鼻侧可见出血; 左眼眼底中心凹光反射消失, 后极部色素不均, 视网膜轻度水肿, 可见视网膜下黄白色渗出 (图 1)。OCT 检查可见左眼黄斑部多发性囊样低反射暗区、神经上皮高反射灶及近中心凹处的外层视网膜管样结构 (outer retinal tubulation, ORT) (图 2), ORT 位于外丛状层, 为椭圆形, 病灶壁为高反射信号, 其内为低反射区和点状高信号灶, 其下方 RPE 反射条带不连续。FFA 早期可见左眼黄斑区有不规则高荧光团, 晚期弥散高荧光 [隐匿性脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV)] (图 3)。初步诊断: 左眼湿性 AMD。给予抗 VEGF 药物玻璃体腔注射, 参照文献 [1] 的方法制定治疗方案, 即每个月玻璃体腔注射 0. 5 mg 雷珠单抗 1 次, 首次治疗 3 个月, 之后每个月进行随访, 根据患者视力变化、OCT 图像的表现和眼底改变再按需注射。在随后 12 个月中, 患者再进行雷珠单抗玻璃体腔注射共 10 次, 随访过程中 BCVA 和中心凹厚度改变见表 1。于注射后 1、3 和 12 个月随访时采用视觉相关生活质量量表 (vision related quality of life questionnaire, VRQOL) [2] 对患者的生活质量进行评估, 结果见表 2。患者前 3 个月连续 3 次玻璃体腔注射雷珠单抗后黄斑中心凹厚度明显变薄 (图 4), 主诉视物稍清



CNV 完全融合, 无法区分。

图 1 患者双眼眼底彩色照片 A: 右眼眼底后极部可见色素沉积和萎缩灶, 病灶鼻侧可见出血 B: 左眼眼底中心凹光反射消失, 后极部色素紊乱及视网膜水肿, 视网膜下可见黄白色渗出 图 2 左眼 OCT 检查图像 左眼中心区视网膜增厚, 黄斑区视网膜呈囊样液性低反区 (白箭头) 及 ORT (红箭头) 图 3 左眼 FFA 影像 A: 动脉期可见后极部小片高荧光团 (红箭头) B: 动静脉期可见高荧光团面积扩大 (红箭头) C: 静脉期病灶呈大片状高荧光区 (白箭头内), 红箭头显示经典 CNV 成分 D: 晚期可见无确定来源的荧光素渗漏 (白箭头内), 红箭头显示经典 CNV 成分与周围隐匿

楚, 但检查 BCVA 略下降, 在之后 9 个月的随访中接受 7 次雷珠单抗玻璃体腔注射, 末次随访 BCVA 从基线的 41 个字母提高到 60 个字母, 黄斑水肿消退, 但 ORT 形态无变化。

表 1 患眼随访期间视力及中心凹厚度变化

随访时间(月)	中心凹厚度(μm)	字母数 (ETDRS)	是否抗 VEGF 治疗
0	445	41	是
1	215	38	是
2	205	42	是
3	191	36	是
4	194	41	否
5	229	49	是
6	198	55	是
7	199	60	是
8	194	54	是
9	202	56	否
10	242	53	是
11	213	55	是
12	212	60	否

注: ETDRS: 早期治疗糖尿病视网膜病变研究