

· 实验研究 ·

ILK-siRNA-AAV 对大鼠青光眼滤过术后滤过通道瘢痕形成的抑制作用

邢瑶¹ 王建明¹ 范雅稚¹ 熊蕾¹ 王文菁¹ 崔丽珺²

¹西安交通大学第二附属医院眼科, 西安 710004; ²西安交通大学第一附属医院眼科, 西安 710061

通信作者: 崔丽珺, Email: grace_cuicui@163.com

【摘要】 目的 观察整合素连接激酶-小干扰 RNA-特异性腺相关病毒 (ILK-siRNA-AAV) 对大鼠青光眼滤过术后滤过通道瘢痕形成的抑制作用。方法 选取 SPF 级 8~9 周龄 SD 大鼠 48 只, 采用随机数表法将其分为空白对照组、ILK-siRNA-AAV 组、NC-siRNA-AAV 组和丝裂霉素 C (MMC) 组, 每组 12 只。每只大鼠均取左眼为实验眼, 右眼不做特殊处理。采用前房植入引流管法建立大鼠青光眼滤过术球结膜滤过泡模型, 空白对照组、ILK-siRNA-AAV 组和 NC-siRNA-AAV 组术后 1 d 滤过泡内分别注入磷酸盐缓冲液、ILK-siRNA-AAV 和 NC-siRNA-AAV 各 5 μ l, MMC 组术中采用含 0.4 mg/ml MMC 的小棉片置于结膜瓣下 5 min。术前及术后 1、2、3、7、14、21、28 d, 采用手持式眼压计测量术眼眼压; 术后 1、2、3、7、14、21、28 d, 采用手术显微镜观察术眼滤过泡形成情况, 采用 Kaplan-Meier 生存分析计算滤过泡生存天数; 术后 28 d, 采用逆转录 PCR 及 Western blot 法检测术区结膜及结膜下组织中 ILK 的 mRNA 及蛋白表达, 检测 ILK 基因沉默效应; 采用苏木精-伊红染色观察 ILK 基因沉默对滤过通道组织形态的影响; 采用 Masson 染色观察 ILK 基因沉默对球结膜滤过泡术区组织胶原纤维沉积作用, 计算胶原纤维染色阳性面积占整个组织视野面积的百分比。结果 各组大鼠手术前后不同时间点眼压总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 76.84, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 114.49, P < 0.001$), 其中 ILK-siRNA-AAV 组术后第 1、7、14 和 28 天眼压均低于空白对照组, MMC 组术后第 2、3、7、14 和 28 天眼压均低于空白对照组, ILK-siRNA-AAV 组术后第 7、14、21 和 28 天眼压均低于 NC-siRNA-AAV 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存分析结果显示, 空白对照组、NC-siRNA-AAV 组、ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组滤过泡生存天数分别为 (3.50 \pm 1.51)、(5.00 \pm 3.41)、(31.50 \pm 3.15) 和 (31.33 \pm 2.46) d, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 395.83, P < 0.05$), 其中 ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组滤过泡生存天数均多于空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。各组 ILK mRNA 及蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 222.32, 752.69$, 均 $P < 0.05$), 其中 ILK-siRNA-AAV 组 ILK mRNA 及蛋白相对表达量明显低于空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。苏木精-伊红染色结果显示, 空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组术区纤维结缔组织增生, 细胞大量增生, 成纤维细胞密度高, 呈团块状生长; ILK-siRNA-AAV 组球结膜较薄, 纤维结缔组织排列疏松, 少量成纤维细胞增生; MMC 组结膜纤维层疏松、菲薄, 形成空洞, 细胞稀少。各组胶原纤维染色阳性面积百分比总体比较差异有统计学意义 ($F = 741.66, P < 0.05$), 其中与空白对照组比较, ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组阳性染色百分比显著降低, ILK-siRNA-AAV 组阳性染色百分比明显低于 NC-siRNA-AAV 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 ILK-siRNA-AAV 沉默 ILK 表达可抑制大鼠滤过术后滤过区组织瘢痕形成, 降低眼压。

【关键词】 青光眼; 滤过手术; 整合素连接激酶; 基因沉默; 小干扰 RNA; 腺相关病毒; 瘢痕形成; SD 大鼠

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2020SF-265、2021SF-332)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210617-00362

Inhibitory effect of ILK-siRNA-AAV on scar formation after glaucoma filtering surgery in rats

Xing Yao¹, Wang Jianming¹, Fan Yazhi¹, Xiong Lei¹, Wang Wenjing¹, Cui Lijun²

¹Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ²Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding author: Cui Lijun, Email: grace_cuicui@163.com

[Abstract] Objective To investigate the role of integrin-linked kinase (ILK)-small interfering RNA (siRNA)-adeno-associated virus (AAV) in scar formation after glaucoma filtering surgery in rat eyes. **Methods** Forty-eight Sprague Dawley rats of SPF grade, aged 8 to 9 weeks old, were selected and divided into blank control group, ILK-siRNA-AAV group, NC-siRNA-AAV group and mitomycin C (MMC) group by random number table method, with 12 rats in each group. Left eyes of the rats were taken as experimental eyes, and no intervention was administered to fellow eyes. The bulbar conjunctival filtering bleb after glaucoma filtration surgery in rats was established by anterior chamber drainage tube implantation. One day after operation, phosphate buffer solution, ILK-siRNA-AAV, and NC-siRNA-AAV were injected into the filtering bleb of blank control group, ILK-siRNA-AAV group and NC-siRNA-AAV group, 5 μ l each group, respectively. Cotton tablets containing 0.4 mg/ml MMC were placed under conjunctival flap for 5 minutes during operation in MMC group. Intraocular pressure (IOP) was measured with a handheld tonometer before surgery and at 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 days after surgery. Formation of filtering blebs in rats was observed with a surgical microscope at 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 days after operation, and the bleb survival time was calculated by Kaplan-Meier survival analysis. The mRNA and protein expression levels of ILK in conjunctival and subconjunctival tissues at the surgical sites were detected by reverse transcription PCR and Western blot, respectively, on the 28th day after operation. Silencing of *ILK* gene was identified. Effect of *ILK* gene silencing on the morphology of drainage pathway was observed by hematoxylin-eosin staining. Effect of *ILK* gene silencing on collagen fiber deposition in the bulbar conjunctiva at filtration area was examined by Masson staining, and the percentage of positive area of collagen fiber staining in the total tissue visual field was calculated. The use and care of the animals complied with the ARVO Statement. This research protocol was approved by an Ethics Committee of Xi'an Jiaotong University (No. 2013-772). **Results** There were statistically significant differences in IOP at different time points between before and after surgery among four groups ($F_{\text{group}} = 76.84, P < 0.001; F_{\text{time}} = 114.49, P < 0.001$). The IOP of ILK-siRNA-AAV group on the 1st, 7th, 14th and 28th day after operation and the IOP of MMC group on the 2nd, 3rd, 7th, 14th and 28th day after operation were lower than those of blank control group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The IOP of ILK-siRNA-AAV group was lower on 7th, 14th, 21st and 28th day after operation than those of NC-siRNA-AAV group, with statistically significant differences (all at $P < 0.05$). The bleb survival time of blank control group, NC-siRNA-AAV group, ILK-siRNA-AAV group and MMC group was (3.50 ± 1.51), (5.00 ± 3.41), (31.50 ± 3.15) and (31.33 ± 2.46) days, respectively, with a significant difference among them ($F = 395.83, P < 0.05$). The bleb survival time of ILK-siRNA-AAV group and MMC group was higher than that of blank control group and NC-siRNA-AAV group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). There were statistically significant differences in the relative expression levels of ILK mRNA and protein among four groups ($F = 222.32, 752.69$; both at $P < 0.05$), and the relative expression levels of ILK mRNA and protein were significantly lower in ILK-siRNA-AAV group than blank control group and NC-siRNA-AAV group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). Proliferative fibrous connective tissue and a large number of cells at surgical sites were found in blank control group and NC-siRNA-AAV group, and the fibroblasts were of a high density and grew in clumps. In ILK-siRNA-AAV group, the bulbar conjunctiva was thin, and the arrangement of fibrous connective tissue was loose, and a few proliferative fibroblasts were found. In MMC group, the conjunctival fibrous layer was loose and thin, forming cavities, and scarce cells were found. There was statistically significant difference in the percentage of collagen fiber positive staining area among four groups ($F = 741.66, P < 0.05$). The positive staining percentage of ILK-siRNA-AAV group and MMC group was significantly lower than that of blank control group, among which there was lower positive staining percentage in ILK-siRNA-AAV group than NC-siRNA-AAV group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Silencing of *ILK* can inhibit the scar formation after glaucoma filtering surgery and maintain low IOP in rats.

[Key words] Glaucoma; Filtering surgery; Integrin-linked kinase; Gene silencing; Small interfering RNA; Adeno-associated virus; Scar formation; SD rats

Fund program: Key Research and Development Programs of Shaanxi Province (2020SF-265, 2021SF-332)
DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210617-00362

降低眼压是青光眼治疗中唯一经过多中心验证、有确切临床疗效的治疗方案^[1-3]。早期手术仍是主要



青光眼的治疗方法,青光眼滤过手术是经典和广泛应用的手术方式,而术后滤过泡瘢痕形成阻碍房水引流,引起眼压升高,是导致手术失败的主要原因^[4]。整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是整合素信号通路的关键激酶,参与调控创伤愈合中成纤维细胞的增生、迁移、侵袭、分化和收缩等关键步骤。本课题组前期在体外培养人 Tenon 囊成纤维细胞(human Tenon fibroblasts, HTFs)中转染 ILK-小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)-慢病毒,特异性沉默 ILK 表达,发现 ILK 沉默后在转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 2 作用下 HTFs 活性减弱,迁移、转分化和合成细胞外基质能力均降低,细胞凋亡增加;细胞周期中 G1/G0 期细胞比例升高,引起 G1 期阻滞,提示在离体培养的 HTFs 中沉默 ILK 可对细胞活化产生抑制作用^[5]。而在体环境更为复杂,大鼠球结膜滤过泡模型中 ILK 沉默是否能发挥抗瘢痕形成作用仍需要进一步探讨。本研究拟采用大鼠青光眼滤过术后滤过泡内 ILK-siRNA-腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)注射法观察 ILK 基因沉默对术区组织瘢痕形成的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 8~9 周龄 SD 大鼠 48 只, 体质量 200~300 g, 由西安交通大学医学实验动物中心提供,均排除眼部疾患,饲养于(23.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C、湿度为 65%~66%动物房内,自由饮食进水。实验动物的使用和喂养符合实验动物伦理规范并遵循美国视觉和眼科研究协会的动物使用宣言规定。本研究方案经西安交通大学医学部医学伦理委员会审核批准(批文号:2013-772)。

1.1.2 主要试剂及仪器 水合氯醛(上海山浦化工有限公司);多聚甲醛(天津科密欧化学试剂有限公司);O. C. T 组织包埋剂(美国 McCormick Scientific 公司);Masson 三色染色液(西安赫特生物科技有限公司);Triton X-100(美国 Amresco 公司);DNA 上样缓冲液(D0071)、50 倍 TAE(ST716)、NA-red(D0128)、总 RNA 抽提试剂盒(上海碧云天生物技术公司);cDNA 合成试剂盒(日本 Takara 公司);Super DNA Marker、质粒 DNA 小量、大量抽提试剂盒(北京康为世纪生物公司);大肠杆菌菌株 DH5 α (美国 Invitrogen 公司);限制性内切酶、T4 连接酶、琼脂糖、琼脂粉(Sangon Biotech)、DNA ladder(美国 Thermo Fisher 公司);凝胶回收试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司);兔抗单克隆 ILK 抗体(ab52480)、小鼠抗单克隆 β -actin 抗体

(ab6276)、山羊抗兔 IgG-HRP 抗体(ab6721)、山羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体(ab6789)(美国 Abcam 公司)。组织机械粉碎仪(PT 2100,瑞士 Poly Tron 公司);超声破碎仪(VCX500,美国 Sonics 公司);超速冷冻离心机(3K30,德国 Sigma 公司);ND-1000 核酸蛋白定量仪(美国 Nano Drop 公司);逆转录 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司);医用耐高温高压毛细管(0.3 mm \times 0.8 mm,上海九华设备公司);回弹式眼压计 SW-500(天津索维电子技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 带有 ZsGreen 荧光标记 ILK-siRNA-AAV 载体的构建 选用干扰载体 pHBAAV-U6-ZsGreen,目的片断插入 BamHI 和 EcoRI 位点,由 U6 启动子调控,该载体中含有 CMV 启动子调控的 ZsGreen 基因标记。设计合成针对 SD 大鼠的干扰病毒载体:干扰基因为 *Rattus norvegicus* ILK mRNA, complete cds GI 为 13111652;Target 为 GACGCTCAGCAGACATGTGGA;引物退火形成带黏性末端的双链片段,引物由上海汉恒生物公司合成;将 PAGE 胶纯化的 oligo 序列分别稀释至 100 μ mol/L;后续病毒包装委托上海汉恒生物公司完成。对照病毒载体上 siRNA 序列和 shRNA 序列如下:siRNA 序列为 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGTAA-3';shRNA 序列正义链为 5'-GATCCGTTCTCCGAACGTGCACGTAATTCAAGAGATTACGTGACACGTTCCGAGAA TTTTTC-3',反义链为 5'-AATTCAAAAAATTCTCCG AACGTGTCACGTAATCTCTTGAATTACGTGACACGTTCCGAGAACG-3'。干扰序列设计如下:siRNA1 序列为 5'-GACGCTCAGCAGACATGTGGA-3';shRNA1 序列正义链为 5'-GATCCGACGCTCAGCAGACATGTGGATT CAAGAGATCCACATGTCTGCTGAGCGTCTTTTTTC-3',反义链为 5'-AATTGAAAAAAGACGCTCAGCAGACATGTGGATCTCTTGAATCCACATGTCTGCTGAGCGTCG-3'。

1.2.2 大鼠抗青光眼滤过术 采用盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉,测量双侧基础眼压。大鼠腹腔内注射质量分数 10%水合氯醛(320~350 mg/kg),选取左眼为手术眼,右眼无特殊处理。手术显微镜下剪开外眦部位,暴露颞上象限。12:30~2:30 位沿角巩缘剪开球结膜,做以穹隆为基底的结膜瓣,向后分离结膜下及筋膜组织。于角膜缘 0.2 mm 处用 5 ml 空针针头呈 45 $^{\circ}$ 角倾斜穿刺至前房,制作穿刺通道。将医用毛细管剪成约 3 mm、两头带斜面的房水引流管,一端沿穿刺通道插入前房,一端用 10-0 缝线固定于巩膜壁。结膜复位,10-0 尼龙线缝合结膜囊两端,确保房水无渗漏。

1.2.3 实验动物分组及处理 采用随机数表法将大

鼠随机分为空白对照组、ILK-siRNA-AAV 组、NC-siRNA-AAV 组和丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 组, 每组 12 只。空白对照组、ILK-siRNA-AAV 组和 NC-siRNA-AAV 组于滤过术后 1 d, 采用 32G 胰岛素针分别吸取磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、ILK 特异性 AAV 重组体和阴性对照 AAV 5 μ l 轻柔注入滤过泡内, MMC 组术中使用含 0.4 mg/ml MMC 的小棉片置于结膜瓣下 5 min。

1.2.4 眼压测量及手术区组织大体观察 (1) 眼压测量 术前及术后 1、2、3、7、14、21 和 28 d, 9:00~10:00 大鼠腹腔内注射 10% 水合氯醛 (320~350 mg/kg), 待大鼠麻醉后, 采用手持回弹式眼压计测量双眼眼压, 每眼测量 3 次, 取平均值。(2) 手术区组织大体观察 术后 1、2、3、7、14、21 和 28 d, 手术显微镜下观察结膜充血, 角膜混浊, 前房留置管位置, 虹膜、瞳孔及晶状体情况和滤过泡形态, 观察是否有出血、炎症及内置管脱落等手术并发症发生, 并拍照记录。采用 Kaplan-Meier 生存分析计算滤过泡生存天数。

1.2.5 逆转录 PCR 法检测 ILK mRNA 表达 术后 28 d, 各组分别选取 5 只大鼠, 腹腔内注射 10% 水合氯醛深度麻醉大鼠, 采用颈椎脱臼法将其处死, 手术显微镜下取各组大鼠术眼眼球, 小心剥离术区结膜及结膜下组织, 转移至冰上的离心管中, 按照总 RNA 抽提试剂盒 (离心柱式) 说明书进行操作, 提取纯化的总 RNA。采用 ND-1000 核酸定量仪测定 RNA 浓度及吸光度 (absorbance, A) 值。逆转录反应体系为: 5 倍 PrimeScript RT Master Mix 4 μ l, 总 RNA 1 000 ng (3~5 μ l), RNase Free dH₂O 加至 20 μ l; 反应条件为: 37 $^{\circ}$ C 逆转录反应 15 min, 85 $^{\circ}$ C 逆转录酶失活反应 5 s, 4 $^{\circ}$ C 保存 30 min。冰上冷却至 4 $^{\circ}$ C, 用于下一步 PCR 使用。ILK 正向引物序列为 5'-ACGCTGCTATGGACGACATT-3', 反向引物序列为 5'-CATGATCAGCATTCAACCACT-3'; GAPDH 正向引物序列为 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3', 反向引物序列为 5'-ATGCTGCTGAAGACGCCAGTA-3'; 反应体系: 2 倍 Master Mix 12.5 μ l, cDNA 3.0~5.0 μ l, 引物各 0.5 μ l, 加 ddH₂O 至总体积 25.0 μ l; 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C (ILK) 或 54 $^{\circ}$ C (GAPDH) 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。3% 琼脂糖凝胶每个梳孔加入 10 μ l PCR 扩增产物。以 100 V 电压、45 mA 电流电泳 30 min, 采用 GelDoc200 型全自动凝胶成像分析系统观察并拍照。以 GAPDH 为内参, 计算 ILK mRNA 相对表达水平。

1.2.6 Western blot 法检测 ILK 蛋白表达 取 1.2.5

部分剥离的结膜及结膜下组织转移至冰上的离心管中, 分别提取细胞总蛋白。SDS-PAGE 蛋白电泳: 将配好胶的玻璃板固定在电泳槽中, 加入电泳缓冲液。用微量加样器将样品缓慢注入加样孔中, 每孔 10 μ l。80 V 电泳 40~50 min, 120 V 电泳 90~120 min。蛋白转膜: 将 PVDF 膜和凝胶置于半干转印电泳仪中央, 转印 90 min。将转印好的 PVDF 膜置于含有质量分数 5% 脱脂奶粉封闭液的孵育盒中, 室温条件下在摇床上孵育 1 h。将膜放入杂交袋中, 加入用 5% 脱脂奶粉封闭液稀释的 ILK (1:1 000) 和 β -actin (1:1 000), 封闭杂交袋, 室温下轻摇孵育 1 h, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。采用 TBST 将膜漂洗 15 min, 共 3 次。加入 HRP 标记的二抗 (1:100 000), 室温孵育 2 h。采用 TBST 漂洗 15 min, 共 3 次。ECL 化学发光显色并用凝胶成像分析系统拍照。采用 ImageJ 软件对蛋白条带进行灰度分析, 以 β -actin 为内参, 计算目的蛋白相对表达量。独立重复实验 3 次。

1.2.7 苏木精-伊红染色法观察各组大鼠滤过泡组织形态学变化 术后 28 d, 各组分别取 2 只大鼠, 腹腔内注射 10% 水合氯醛深度麻醉大鼠, 采用颈椎脱臼法将其处死, 左心室快速灌注 4 $^{\circ}$ C 预冷 0.9% 氯化钠溶液 200 ml 和预冷质量分数 4% 多聚甲醛 500 ml, 取出完整双侧眼球, 注意保护好结膜组织。将眼球置于 4% 多聚甲醛溶液中 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h。梯度蔗糖溶液脱水。将 O.C.T 包埋好的组织在冰冻切片机上进行冠状连续切片, 小心挑出晶状体避免破坏周围组织, 以缝线为标志定位结膜瓣及结膜下组织, 切片厚度为 12 μ m, 直接贴片黏附于载玻片上, 于 37 $^{\circ}$ C 烘箱内干燥后, 进行下一步实验。体积分数 95% 乙醇脱水 2 min, ddH₂O 中水化 4 min, 苏木素染色 3~5 min, 流动的自来水洗片 5 min, 酸乙醇中浸泡 3~5 s, 自来水洗蓝化 3~5 min, 伊红染色 30 s, 梯度乙醇脱水固定, 二甲苯透化 1 min, 中性树脂胶封片, 自然风干, 光学显微镜下观察滤过通道形态并拍照。

1.2.8 Masson 染色法观察术区组织胶原纤维沉积情况 术后 28 d, 各组分别取 5 只大鼠, 处死大鼠及制备完整眼球冰冻切片方法同 1.2.7。取各组冰冻切片, PBS 漂洗 2 min; 苏木素染色 10 min; 流动的自来水漂洗 10 min; 蒸馏水漂洗 5 s; 比布列猩红染液染色 13 min; 蒸馏水快速漂洗 5 s, 漂洗 3 次; 用缓冲液分化 13 min, 直至胶原不显示红色; 将切片直接转移入苯胺蓝染液中, 染色 8 min; 蒸馏水直接漂洗 5 s; 体积分数 1% 酸乙醇分色 3 min; 蒸馏水漂洗 5 s; 95% 乙醇、100% 乙醇快速脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片; 待切

片干燥后置于显微镜下观察并拍照,巩膜组织中胶原纤维呈蓝色阳性染色。Masson 染色分析胶原纤维沉积程度:400 倍视野下,每张切片随机选取 10 个互不重叠的术区结膜组织视野,采用 ImageJ 软件对采集的图片结果进行分析,计算蓝色胶原纤维染色面积的 A 值,根据视野中胶原纤维染色阳性面积占整个组织视野面积的百分比进行半定量分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析,Graph Pad Prism v5.0 软件作图。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 Levene 检验证实方差齐。各组大鼠术前及术后不同时间点眼压差异比较采用重复测量两因素方差分析,各组大鼠球结膜滤过泡术区组织 ILK mRNA 和蛋白相对表达量、滤过泡生存时间、胶原纤维染色面积的 A 值总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行抗青光眼滤过术前后不同时间点眼压比较

各组大鼠手术前后不同时间点眼压总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 76.84, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 114.49, P < 0.001; F_{\text{交互作用}} = 5.48, P < 0.001$),其中 NC-siRNA-AAV 组术后第 1 天眼压低于空白对照组,ILK-siRNA-AAV 组术后第 1、7、14 和 28 天眼压均低于空白对照组,MMC 组术后第 2、3、7、14 和 28 天眼压均低于空白对照组,ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组术后第 7、14、21 和 28 天眼压均低于 NC-siRNA-AAV 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 1)。

2.2 各组大鼠行抗青光眼滤过术后滤过泡特征及生

存时间比较

2.2.1 各组大鼠术后不同时间点术眼眼前节反应及滤过泡特征比较 术后第 1 天,各组手术区域均可见结膜轻度充血及弥散、较扁平的滤过泡。术后第 2 天,除 MMC 组外,其他各组结膜充血和角膜轻度混浊消失。术后第 3 天,各组炎症反应均消失,角膜透亮,可看到插入前房的引流微管,滤过泡隆起、透明,范围超过 3 个钟点。术后第 7 天,空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组滤过泡局限消失,结膜组织、苍白增厚,与下方巩膜粘连;ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组仍可见隆起的滤过泡,其中 MMC 组滤过泡壁菲薄、苍白。术后第 14 天,空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组结膜增厚、苍白,包裹下方内置管;ILK-siRNA-AAV 组滤过泡变扁平,MMC 组仍可见薄壁、苍白滤过泡。术后第 21 天和第 28 天,空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组术区无明显变化,结膜呈灰白增厚状态;ILK-siRNA-AAV 组仍可见扁平滤过泡;MMC 组滤过泡泡壁未见血管,呈苍白色(图 1)。

2.2.2 各组滤过泡生存天数比较 Kaplan-Meier 生存分析结果显示,空白对照组、NC-siRNA-AAV 组、ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组滤过泡生存天数分别为 (3.50 ± 1.51) 、 (5.00 ± 3.41) 、 (31.50 ± 3.15) 和 (31.33 ± 2.46) d,总体比较差异有统计学意义 ($F = 395.83, P < 0.05$),其中 ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组滤过泡生存时间均长于空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 2)。

2.3 各组大鼠球结膜滤过泡组织中 ILK mRNA 表达比较

逆转录 PCR 结果显示,ILK-siRNA-AAV 组 ILK mRNA 表达条带较弱,空白对照组、NC-siRNA-AAV 组和 MMC 组 ILK mRNA 表达条带强(图 3)。空白对

表 1 各组大鼠行抗青光眼滤过术前后不同时间点眼压比较 ($\bar{x} \pm s, \text{mmHg}$)
Table 1 Comparison of intraocular pressure at various time points before and after glaucoma filtering surgery among four groups ($\bar{x} \pm s, \text{mmHg}$)

| 组别 | 眼数 | 手术前后不同时间点眼压值 | | | | | | | |
|-----------------|----|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| | | 术前 | 术后第 1 天 | 术后第 2 天 | 术后第 3 天 | 术后第 7 天 | 术后第 14 天 | 术后第 21 天 | 术后第 28 天 |
| 空白对照组 | 12 | 10.75±1.28 | 6.08±1.56 | 6.58±1.38 | 6.67±1.15 | 10.33±1.30 | 9.67±1.15 | 9.17±1.11 | 9.75±0.97 |
| NC-siRNA-AAV 组 | 12 | 11.66±1.37 | 4.75±0.87 ^a | 7.17±0.83 | 7.67±0.89 | 10.17±1.11 | 10.50±1.00 | 10.08±1.56 | 10.83±1.75 |
| ILK-siRNA-AAV 组 | 12 | 11.58±0.99 | 4.08±0.51 ^a | 5.50±1.51 | 5.75±1.42 | 6.00±1.21 ^{ab} | 7.92±0.99 ^{ab} | 8.33±1.97 ^b | 6.67±1.61 ^{ab} |
| MMC 组 | 12 | 11.21±1.44 | 5.08±1.88 | 4.33±1.49 ^a | 4.58±1.68 ^a | 6.42±0.67 ^{ab} | 7.42±1.16 ^{ab} | 8.08±1.24 ^b | 7.17±1.03 ^{ab} |

注: $F_{\text{分组}} = 76.84, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 114.49, P < 0.001; F_{\text{交互作用}} = 5.48, P < 0.001$ 。与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 NC-siRNA-AAV 组比较, ^b $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-t 检验) siRNA: 小干扰 RNA; AAV: 腺相关病毒; ILK: 整合素连接激酶; MMC: 丝裂霉素 1 mmHg = 0.133 kPa

Note: $F_{\text{group}} = 76.84, P < 0.001; F_{\text{time}} = 114.49, P < 0.001; F_{\text{interaction}} = 5.48, P < 0.001$. Compared with blank control group, ^a $P < 0.05$; compared with NC-siRNA-AAV group, ^b $P < 0.05$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD-t test) siRNA: small interfering RNA; AAV: adeno-associated virus; ILK: integrin-linked kinase; MMC: mitomycin C 1 mmHg = 0.133 kPa

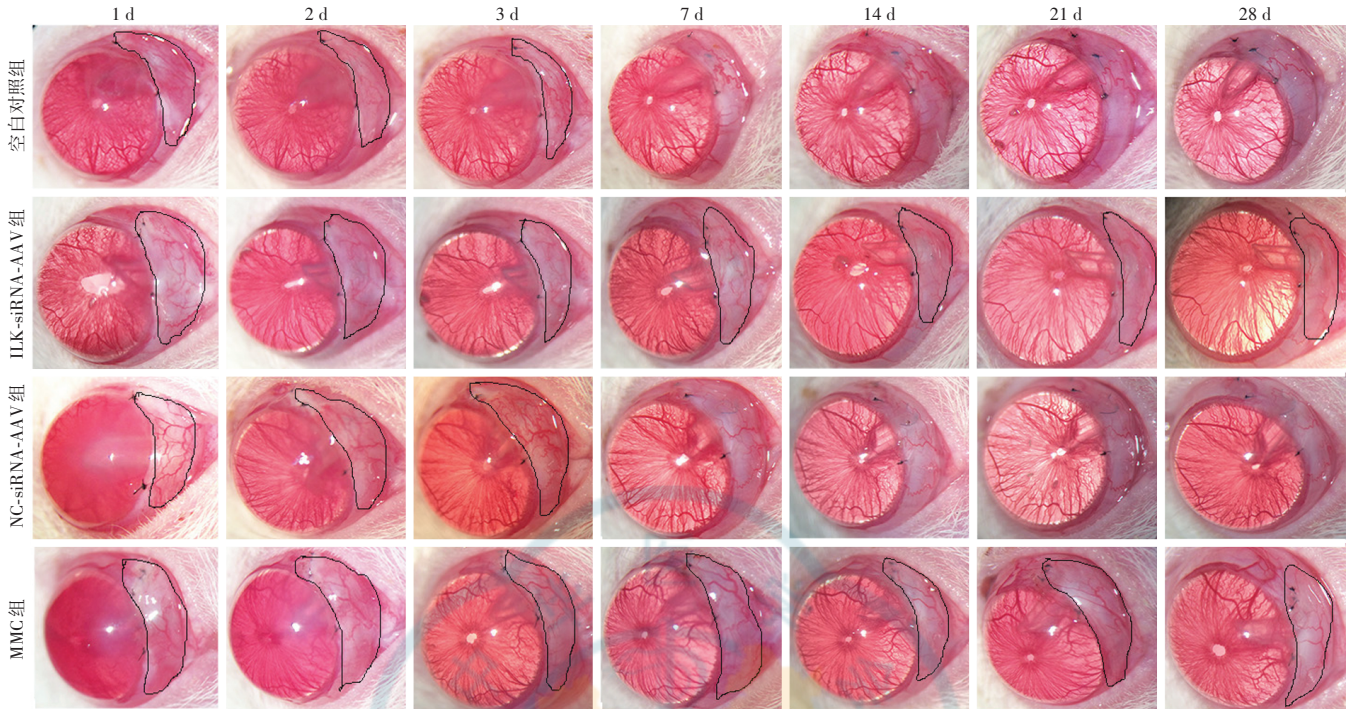


图 1 各组大鼠行抗青光眼滤过术后不同时间点滤过泡变化(×16) 术后第 1~3 天, 各组手术区域均可见滤过泡隆起。术后第 7 天, 空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组滤过泡局限消失, 结膜组织苍白增厚。术后第 14~28 天, ILK-siRNA-AAV 组仍可见扁平滤过泡, MMC 组滤过泡泡壁无血管, 呈苍白色, 空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组术区结膜呈灰白增厚状态 ILK: 整合素连接激酶; siRNA: 小干扰 RNA; AAV: 腺相关病毒; MMC: 丝裂霉素 C

Figure 1 Morphological changes of filtering blebs over time under surgical microscope (×16) Bulged filtering blebs in surgical sites were found in different groups within 1 to 3 days after operation. Seven days after operation, localized filtering blebs disappeared and the conjunctival tissue was pale and thickened in normal control group and NC-siRNA-AAV group. Fourteen to twenty-eight days after operation, flat filtering blebs were seen in ILK-siRNA-AAV group; avascular and pale filtration blebs were found in MMC group; gray and thickened filtering blebs were observed in blank control group and NC-siRNA-AAV group ILK: integrin-linked kinase; siRNA: small interfering RNA; AAV: adeno-associated virus; MMC: mitomycin C

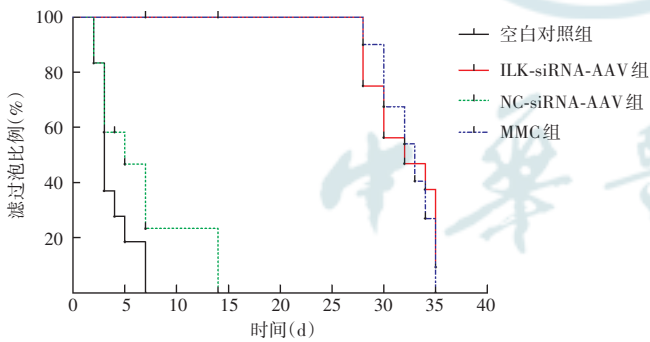


图 2 各组大鼠行抗青光眼滤过术后滤过泡 Kaplan-Meier 生存曲线 ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组滤过泡生存时间明显长于空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组 ILK: 整合素连接激酶; siRNA: 小干扰 RNA; AAV: 腺相关病毒; MMC: 丝裂霉素 C

Figure 2 Kaplan-Meier bleb survival curves of rats in different groups The survival time of filtering bleb was longer in ILK-siRNA-AAV and MMC groups than blank control group and NC-siRNA-AAV group ILK: integrin-linked kinase; siRNA: small interfering RNA; AAV: adeno-associated virus; MMC: mitomycin C

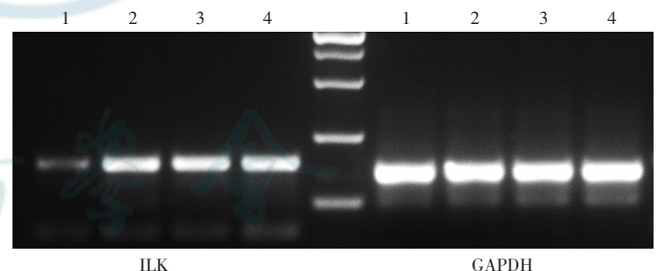


图 3 逆转录 PCR 法检测各组大鼠 ILK mRNA 表达水平 ILK-siRNA-AAV 组 ILK mRNA 表达条带较弱, 空白对照组、NC-siRNA-AAV 组和 MMC 组 ILK mRNA 表达条带强 1: ILK-siRNA-AAV 组; 2: NC-siRNA-AAV 组; 3: MMC 组; 4: 空白对照组 ILK: 整合素连接激酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 3 Expression levels of ILK mRNA in bleb tissue in different groups by RT-PCR Band intensity of ILK mRNA was weak in ILK-siRNA-AAV group and was strong in NC-siRNA-AAV group, MMC group and blank control group 1: ILK-siRNA-AAV group; 2: NC-siRNA-AAV group; 3: MMC group; 4: blank control group ILK: integrin-linked kinase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

对照组、NC-siRNA-AAV 组、ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组 ILK mRNA 相对表达量分别为 0.428 ± 0.020 、

0.349 ± 0.034 、 0.053 ± 0.009 和 0.412 ± 0.022 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 222.32, P < 0.05$), 其中 ILK-

siRNA-AAV 组 ILK mRNA 相对表达量明显少于空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠球结膜滤过泡组织中 ILK 蛋白表达比较

空白对照组、NC-siRNA-AAV 组、ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组 ILK 蛋白相对表达量分别为 0.72 ± 0.01 、 0.76 ± 0.03 、 0.14 ± 0.01 和 0.69 ± 0.03 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 752.69, P < 0.05$), 其中 ILK-siRNA-AAV 组 ILK 蛋白相对表达量明显少于空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

2.5 各组大鼠滤过泡组织形态学比较

术后 28 d, 空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组术区结膜纤维层显著增厚, 纤维结缔组织增生, 排列紧实, 细胞大量增生, 成纤维细胞密度高, 呈团块状生长, 排列混乱, 其间可见腺体及小血管增生; ILK-siRNA-AAV 转染组球结膜较薄, 纤维结缔组织排列疏松, 可见其间空隙, 少量成纤维细胞增生, 排列整齐; MMC 组结膜纤维层疏松, 形成空洞, 细胞稀少, 结膜组织菲薄 (图 5)。

2.6 各组术区组织胶原纤维沉积情况比较

Masson 染色结果显示, 空白对照组及 NC-siRNA-AAV 组术区组织增厚, 胶原纤维沉积增多, 呈致密或疏松束状排列, 或见片状蓝染; ILK-siRNA-AAV 组胶原纤维沉积量少, 可见少量蓝色阳性染色, 呈疏松排列; MMC 组手术区域可见空洞形成及血细胞, 胶原纤维排列疏松 (图 6A)。

术后 28 d, 空白对照组、NC-siRNA-AAV 组、ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组胶原纤维染色阳性面积占整个组织视野面积的百分比分别为 $(87.64 \pm 1.59)\%$ 、 $(82.43 \pm 2.51)\%$ 、 $(46.08 \pm 0.72)\%$ 和 $(51.87 \pm 1.60)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 741.66, P < 0.05$); 其中 ILK-siRNA-AAV 组和 MMC 组阳性染色百分比明显低于空白对照组, ILK-siRNA-AAV 组阳性染色百分比明显低于 NC-siRNA-AAV 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 6B)。

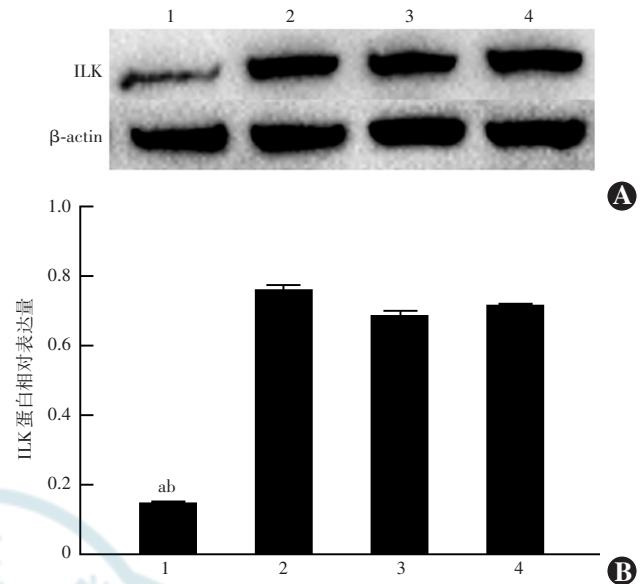


图 4 Western blot 法检测各组大鼠球结膜滤过泡组织中 ILK 蛋白表达比较 A: 各组 ILK 蛋白表达电泳图 B: 各组 ILK 蛋白表达水平量化比较 $F = 752.69, P < 0.05$ 。与空白对照组比较, $^a P < 0.05$; 与 NC-siRNA-AAV 组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 15$) 1: ILK-siRNA-AAV 组; 2: NC-siRNA-AAV 组; 3: MMC 组; 4: 空白对照组 ILK: 整合素连接激酶; β -actin: β 肌动蛋白

Figure 4 Expression levels of ILK protein in bleb tissue in different groups by Western blot A: Electrophoretogram of ILK protein in different groups B: Comparison of ILK protein expression levels among four groups $F = 752.69, P < 0.05$. Compared with blank control group, $^a P < 0.05$; compared with NC-siRNA-AAV group, $^b P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 15$) 1: ILK-siRNA-AAV group; 2: NC-siRNA-AAV group; 3: MMC group; 4: blank control group ILK: integrin-linked kinase

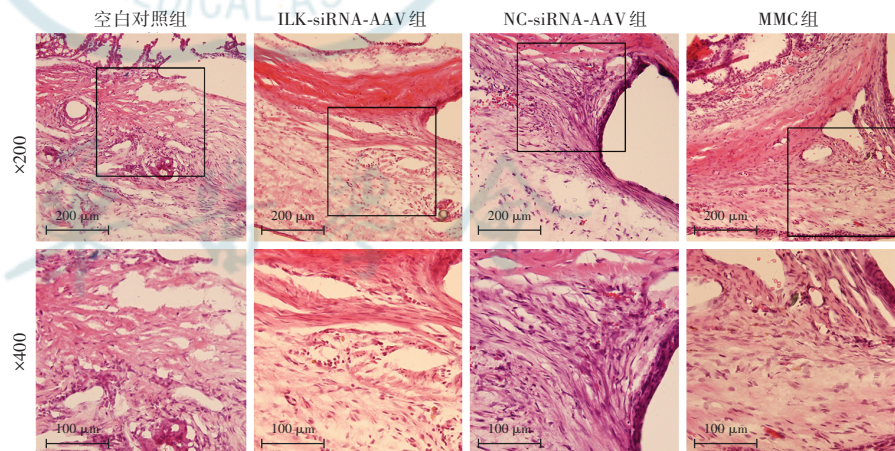


图 5 各组行抗青光眼滤过术后 28 d 术眼滤过泡组织形态学表现 (HE $\times 200$, 标尺 = $200 \mu\text{m}$; $\times 400$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) 空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组术区结膜纤维层显著增厚, 纤维结缔组织增生; ILK-siRNA-AAV 组球结膜较薄, 纤维结缔组织排列疏松; MMC 组细胞稀少, 结膜组织菲薄 下图为方框内所示球结膜下内置管周围组织的放大图 ILK: 整合素连接激酶; siRNA: 小干扰 RNA; AAV: 腺相关病毒; MMC: 丝裂霉素 C

Figure 5 Histopathological changes of filtering blebs in different groups on day 28 after glaucoma filtering surgery (HE $\times 200$, bar = $200 \mu\text{m}$; $\times 400$, bar = $100 \mu\text{m}$) On day 28 after operation, the fiber and connective tissues increased in amount in blank control group. The conjunctival fibrous layer in surgical sites was thickened and proliferation of fibrous connective tissue was found in blank control group and NC-siRNA-AAV group. Bulbar conjunctiva was thin and loose fibrous connective tissue was seen in ILK-siRNA-AAV group; scarce cells and thin conjunctiva were observed in MMC group Pictures below were the subconjunctival tissue around inserted catheter, marked by boxes in top pictures ILK: integrin-linked kinase; siRNA: small interfering RNA; AAV: adeno-associated virus; MMC: mitomycin C

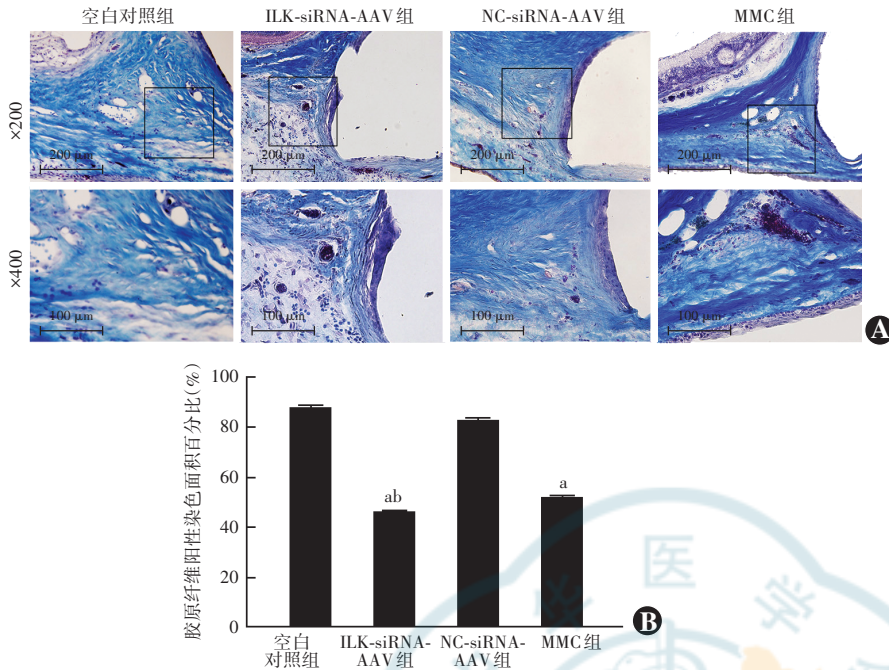


图 6 青光眼滤过术后 28 d 各组大鼠术眼滤过泡组织胶原纤维染色情况比较 A: 各组组织切片 Masson 染色 ($\times 200$, 标尺 = 200 μm ; $\times 400$, 标尺 = 100 μm) 与空白对照组和 NC-siRNA-AAV 组相比, ILK-siRNA-AAV 组胶原纤维沉积量少 下图为方框所示球结膜下内置管周围组织的放大图 B: 各组胶原纤维阳性染色面积百分比比较 $F = 741.66, P < 0.05$. 与空白对照组比较, $^a P < 0.05$; 与 NC-siRNA-AAV 组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 15$) ILK: 整合素连接激酶; siRNA: 小干扰 RNA; AAV: 腺相关病毒; MMC: 丝裂霉素 C

Figure 6 Comparison of collagen fiber deposition among different groups on day 28 after glaucoma filtering surgery by Masson trichrome staining A: Masson trichrome staining of different groups ($\times 200$, bar = 200 μm ; $\times 400$, bar = 100 μm) Deposition of collagen fibers was significantly decreased in ILK-siRNA-AAV group compared with blank control group and NC-siRNA-AAV group Pictures below were the subconjunctival tissue around inserted catheter, marked by boxes in top pictures B: Comparison of the percentage of positive staining of collagen fiber among four groups $F = 741.66, P < 0.05$. Compared with blank control group, $^a P < 0.05$; compared with NC-siRNA-AAV group, $^b P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 15$) ILK: integrin-linked kinase; siRNA: small interfering RNA; AAV: adeno-associated virus; MMC: mitomycin C

3 讨论

ILK 是普遍存在于细胞中的丝/苏氨酸激酶,也是整合素信号通路的关键激酶^[6]。以往关于 ILK 在纤维化及瘢痕形成过程中的作用研究主要集中在肾脏和肝脏纤维化。研究发现,在肾脏纤维化过程中,ILK 参与调节 TGF- $\beta 1$ 诱导的上皮间质转分化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程,并诱导分泌基质金属蛋白酶^[7-8]。ILK 可调节 EMT 过程的初始和关键步骤,在肝脏纤维化研究中,ILK 调节肝星状细胞活化并转化为肌成纤维细胞。同时 ILK 是肝细胞在体内和体外生存的必要条件^[9-10]。已有的很多研究也证实了 ILK 沉默的可行性,在一项抗腹膜纤维化研究中,siRNA 特异性沉默腹膜上皮细胞 ILK 表达,结果显示波形蛋白表达减少、E-钙黏蛋白表达增多,EMT 过程被抑制^[11]。ILK 沉默不仅可有效抑制 TGF- $\beta 1$ 诱导的

EMT 过程^[12-13],而且可以抑制肿瘤细胞的增生和侵袭^[14-16]。在眼科疾病中,晶状体上皮细胞的增生和转分化均与 ILK 活化有关^[17]。ILK 缺乏成纤维细胞表现为肌动蛋白细胞骨架异常,不能形成成熟的黏着斑及张力纤维,最终表现为细胞外基质不能收缩^[18-19]。因此,在青光眼滤过术后,ILK 对抗纤维化反应和瘢痕形成研究尤为重要。本研究构建了针对 ILK 的特异性 AAV,于术后滤过泡内注射,采用 Western blot 法检测 ILK 蛋白的相对表达量,结果显示 ILK-siRNA-AAV 转染可显著抑制活体内结膜及结膜下组织 ILK 蛋白表达;同时本研究对 ILK 抑制效应后大鼠眼压及滤过泡形态变化进行了动态观察,结果提示抑制 ILK 基因表达可维持大鼠青光眼滤过术后低水平眼压,延长滤过泡生存时间。

AAV 是细小病毒科中的一类非致病性病毒,可作为有效基因治疗的载体工具。大量研究表明,AAV 是一种相对稳定的病毒载体,对温度和 pH 值的可耐受范围较宽。AAV 这种稳定的特性,使其有多种给药方式,可以做到特异性给药^[20-21]。同时,AAV 具有安全性高、免疫源性低、宿主范围广及介导基因长期稳定表达、物理性质稳定的特点。因此,本实验选择 AAV 作为 siRNA 载体,结果表明,ILK-siRNA-AAV 可有效抑制滤过术区组织中 ILK 的表达。抗代谢药物 MMC 是目前临床上常用的抗青光眼术后瘢痕形成药物,使用方法通常为术中浸泡有 0.2~0.4 mg/ml MMC 的棉片放置于结膜瓣下巩膜表面 2~5 min。MMC 在抗瘢痕形成的同时,可引起巨大或薄壁滤过泡、角结膜上皮溃疡、角膜内皮毒性、低眼压、滤过泡渗漏和眼内炎等并发症。有研究表明,MMC 并非仅抑制 HTFs 增生,而是直接使细胞凋亡及坏死,过早地抑制了伤口愈合过程^[22-23]。本研究建立了大鼠球结膜滤过泡模型,为了探讨 ILK 沉默对滤过术后伤口愈合的影响,选用临床常用且研究较多的 MMC 作为对照组,以便更加客观地对比 ILK 沉默在此过程中的作用。

本实验实际操作中采用了麻醉大鼠后统一测量眼压,确保多只大鼠在一致状态下测量。与人类相同,大鼠眼压会有昼夜节律影响,因此本实验选择每日同一时间测定眼压。由于麻醉会使大鼠眼压下降^[24-25],麻醉程度和时间均会对眼压产生影响,因此本研究在每次测量时根据大鼠体质量精准计算麻醉药物使用量,并于麻醉时间相同的情况下测量,同时测定大鼠对侧非手术眼眼压作为对照,以排除干扰因素的影响。本研究中测得对照组麻醉状态下的大鼠眼压与 Morrison 等^[26]使用 TonoLab 眼压计测得的麻醉状态下大鼠眼压基本相近。且本实验结果显示,大鼠抗青光眼术后第 1 天眼压比术前降低约 30%,滤过泡弥散隆起,未见严重并发症发生,说明滤过手术成功。术后第 7 天滤过泡即扁平,眼压也恢复至术前水平,滤过功能丧失,说明大鼠组织创伤愈合能力较人类强。

结缔组织中包括胶原纤维、弹性纤维和网状纤维。胶原纤维在结缔组织分布广泛。胶原纤维和网状纤维的基本构造相似,均以胶原单位(蛋白质为主的大分子)为基本单位,主要由成纤维细胞合成。胶原纤维在苏木精-伊红染色中为红色,不能与肌纤维分别,而 Masson 三色染色为结缔组织染色方法之一,可将胶原纤维和肌纤维明显地区分开来;细胞质和肌肉呈红色,胶原纤维呈蓝色,细胞核呈蓝黑色。本研究采用 Masson 三色染色观察胶原纤维沉积情况,证实了抑制大鼠球结膜滤过泡组织中 ILK 表达可抑制纤维结缔组织增生,减少胶原纤维沉积。

综上所述,本研究建立了大鼠球结膜滤过泡模型,发现大鼠青光眼滤过术后瘢痕化反应强,而转染特异性 ILK-siRNA-AAV 抑制术区 ILK 表达后,可使大鼠青光眼滤过术后眼压维持在低水平,延长滤过泡生存时间,并提高滤过泡生存率。抑制 ILK 基因表达可减弱大鼠青光眼滤过术后瘢痕形成反应,减少术区纤维细胞增生和胶原沉积,起到抗瘢痕形成作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 崔丽珺:实验设计、项目管理与指导、数据分析、论文审核和修改;邢瑶:实验设计、实施研究、数据分析、论文撰写及修改;王健明、范雅稚:参与实验设计、论文审阅与修订;熊蕾、王文菁:参与实验设计、数据整理与管理

参考文献

- [1] Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, et al. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial[J]. Arch Ophthalmol, 2002, 120(10): 1268-1279. DOI:10.1001/archophth.120.10.1268.
- [2] Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma[J]. Am J Ophthalmol, 1998, 126(4): 498-505. DOI:10.1016/s0002-9394(98)00272-4.
- [3] Boland MV, Ervin AM, Friedman DS, et al. Comparative effectiveness of treatments for open-angle glaucoma: a systematic review for the U. S. Preventive Services Task Force[J]. Ann Intern Med, 2013, 158(4): 271-279. DOI:10.7326/0003-4819-158-4-201302190-00008.
- [4] Al Habash A, Aljasim LA, Owaidhah O, et al. A review of the efficacy of mitomycin C in glaucoma filtration surgery[J]. Clin Ophthalmol, 2015, 9: 1945-1951. DOI:10.2147/OPHT.S80111.
- [5] Xing Y, Cui L, Kang Q. Silencing of ILK attenuates the abnormal proliferation and migration of human Tenon's capsule fibroblasts induced by TGF- β 2[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(2): 407-416. DOI:10.3892/ijmm.2016.2644.
- [6] Crawford M, Liu N, Mahdipour E, et al. Integrin-linked kinase regulates melanosome trafficking and melanin transfer in melanocytes[J]. Mol Biol Cell, 2020, 31(8): 768-781. DOI:10.1091/mbc.E19-09-0510.
- [7] Li Y, Yang J, Dai C, et al. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis[J]. J Clin Invest, 2003, 112(4): 503-516. DOI:10.1172/JCI17913.
- [8] Li Y, Dai C, Wu C, et al. PINCH-1 promotes tubular epithelial-to-mesenchymal transition by interacting with integrin-linked kinase[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(9): 2534-2543. DOI:10.1681/ASN.2007030315.
- [9] Gkretsi V, Mars WM, Bowen WC, et al. Loss of integrin linked kinase from mouse hepatocytes *in vitro* and *in vivo* results in apoptosis and hepatitis[J]. Hepatology, 2007, 45(4): 1025-1034. DOI:10.1002/hep.21540.
- [10] Zhang Y, Ikegami T, Honda A, et al. Involvement of integrin-linked kinase in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats[J]. Hepatology, 2006, 44(3): 612-622. DOI:10.1002/hep.21315.
- [11] Luo L, Liu H, Dong Z, et al. Small interfering RNA targeting ILK inhibits EMT in human peritoneal mesothelial cells through phosphorylation of GSK-3 β [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1): 137-144. DOI:10.3892/mmr.2014.2162.
- [12] Serrano I, McDonald PC, Lock FE, et al. Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGF β -1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT)[J]. Oncogene, 2013, 32(1): 50-60. DOI:10.1038/onc.2012.30.
- [13] Rabie EM, Zhang SX, Dunn CE, et al. Substratum stiffness signals through integrin-linked kinase and β 1-integrin to regulate midbody proteins and abscission during EMT[J]. Mol Biol Cell, 2021, 32(18): 1664-1676. DOI:10.1091/mbc.E21-02-0072.
- [14] Yao X, Li D, Xiong DM, et al. A novel role of ribonuclease inhibitor in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and ILK signaling pathway in bladder cancer cells[J]. Cell Tissue Res, 2013, 353(3): 409-423. DOI:10.1007/s00441-013-1638-2.
- [15] Xing Y, Qi J, Deng S, et al. Small interfering RNA targeting ILK inhibits metastasis in human tongue cancer cells through repression of epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(13): 2058-2072. DOI:10.1016/j.yexcr.2013.05.014.
- [16] Lin SW, Ke FC, Hsiao PW, et al. Critical involvement of ILK in TGF β 1-stimulated invasion/migration of human ovarian cancer cells is associated with urokinase plasminogen activator system[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(3): 602-613. DOI:10.1016/j.yexcr.2006.11.003.
- [17] Teo ZL, McQueen-Miscamble L, Turner K, et al. Integrin linked kinase (ILK) is required for lens epithelial cell survival, proliferation and differentiation[J]. Exp Eye Res, 2014, 121: 130-142. DOI:10.1016/j.yexcr.2014.01.013.
- [18] Graness A, Giehl K, Goppelt-Struebe M. Differential involvement of the integrin-linked kinase (ILK) in RhoA-dependent rearrangement of F-actin fibers and induction of connective tissue growth factor (CTGF)[J]. Cell Signal, 2006, 18(4): 433-440. DOI:10.1016/j.cellsig.2005.05.011.
- [19] Vi L, de Lasa C, DiGuglielmo GM, et al. Integrin-linked kinase is required for TGF- β 1 induction of dermal myofibroblast differentiation



- [J]. J Invest Dermatol, 2011, 131 (3) : 586-593. DOI: 10. 1038/jid. 2010. 362.
- [20] Wright JF. Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies[J]. Gene Ther, 2008, 15 (11) : 840-848. DOI: 10. 1038/gt. 2008. 65.
- [21] Rayaprolu V, Kruse S, Kant R, et al. Comparative analysis of adeno-associated virus capsid stability and dynamics [J/OL]. J Virol, 2013, 87 (24) : 13150-13160 [2021-06-17]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/24067976/. DOI: 10. 1128/JVI. 01415-13.
- [22] Crowston JG, Chang LH, Constable PH, et al. Apoptosis gene expression and death receptor signaling in mitomycin-C-treated human tenon capsule fibroblasts [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43 (3) : 692-699.
- [23] O'Neill EC, Qin Q, Van Bergen NJ, et al. Antifibrotic activity of bevacizumab on human Tenon's fibroblasts *in vitro* [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51 (12) : 6524-6532. DOI: 10. 1167/iov. 10-5669.
- [24] Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51 (11) : 5690-5696. DOI: 10. 1167/iov. 10-5248.
- [25] Morrison JC, Jia L, Cepurna W, et al. Reliability and sensitivity of the TonoLab rebound tonometer in awake Brown Norway rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50 (6) : 2802-2808. DOI: 10. 1167/iov. 08-2465.
- [26] Morrison JC, Cepurna WO, Tehrani S, et al. A period of controlled elevation of IOP (CEI) produces the specific gene expression responses and focal injury pattern of experimental rat glaucoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57 (15) : 6700-6711. DOI: 10. 1167/iov. 16-20573.

(收稿日期:2021-09-20 修回日期:2022-02-25)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

· 病例报告 ·

肺炎克雷伯菌肝脓肿致双眼内源性眼内炎诊疗 1 例

徐敏 解正高 陈放

扬州大学附属苏北人民医院眼科,扬州 225001

通信作者:陈放,Email:cfyzsbyy@163.com

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20190903-00383

Diagnosis and treatment of binocular endophthalmitis caused by *Klebsiella pneumoniae* hepatic abscess: a case report

Xu Min, Xie Zhenggao, Chen Fang

Department of Ophthalmology, Subei People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

Corresponding author: Chen Fang, Email: cfyzsbyy@163.com

患者,男,40岁,2018年2月8日因发热伴肌肉酸痛4d于扬州大学附属苏北人民医院肝胆内科就诊。患者否认高血压、糖尿病史;体温39.6℃,随机血糖水平为21.9mmol/L,糖化血红蛋白水平为13.3%;上腹部增强CT检查显示肝左叶低密度影,考虑肝脓肿可能;胸部CT平扫结果显示双肺下叶炎症,以“肝脓肿、肺炎、2型糖尿病”收入院。在B型超声引导下行肝脓肿穿刺引流术,穿刺液细菌培养提示肺炎克雷伯菌阳性。根据药物敏感性试验结果予以比阿培南0.3g静脉滴注,每日3次,并采用降血糖等对症治疗,全身情况好转。2018年2月11日因左眼进行性视物模糊2d、右眼视物模糊1d请眼科急会诊。患者否认眼部手术及外伤史。右眼视力数指/眼前,裂隙灯显微镜检查下可见结膜充血,角膜透明,房水混浊,瞳孔直径3mm,对光反射存在,晶状体尚透明,玻璃体腔絮状混浊,扩瞳检查眼底见下方视网膜大片黄白色病灶(图1A);左眼视力光感,结膜充血水肿,角膜轻度水肿,前房积脓2~3mm,虹膜后粘连,瞳孔欠圆,对光反射消失,晶状体尚透明,玻璃体混浊,扩瞳检查眼底见视盘上方黄白色病灶(图1B)。双眼眼压正常。眼部B型超声检查示双眼玻璃体混浊,右眼视网膜向玻璃体腔内隆起(图1C),左眼视网膜脱离(图1D)。诊断:双眼内源性眼内炎。患者要求转上级医院,但因故于次日再次入院。患者诉右眼视物模糊加重,视力光感,前房积脓(图1E),液平略高于左眼(图1F),玻璃体混浊加重。患者空腹血糖水平为

8.2mmol/L,体温36.9℃。于2018年2月13日和14日于全身麻醉下分别行右眼、左眼23G后入路玻璃体切割+晶状体超声乳化+硅油注入+双眼玻璃体腔注药术(10g/L万古霉素0.1ml+20g/L头孢他啶0.1ml)。左眼中见视网膜下大量黄白色脓苔样物质,切开视网膜后尽量清除(图2)。双眼玻璃体标本液细菌及真菌培养结果均为阴性。术后第2天右眼前房再次积脓,行上述抗生素右眼玻璃体腔注射,降血糖及全身控制感染用药方案同术前,患者血糖及体温均稳定。患者2018年3月5日出院,双眼裸眼视力数指/50cm,角膜透明,前房清(图3A,B),晶状体及囊膜缺如,玻璃体腔硅油填充,视网膜平伏,可见散在激光斑(图3C,D)。后因增生性玻璃体视网膜病变伴视网膜脱离,于2019年6月12日和2019年7月31日分别行右眼和左眼玻璃体腔硅油置换术。患者出院后定期门诊复查,2019年10月10日复查最佳矫正视力右眼0.1,左眼0.2,目前仍在随访中。

讨论:内源性眼内炎的主要原发感染病灶是肝脓肿,致病菌以肺炎克雷伯菌为主^[1]。糖尿病不仅是诱发肺炎克雷伯菌肝脓肿的危险因素,也是诱发肺炎克雷伯菌肝脓肿伴侵袭性感染的危险因素。肺炎克雷伯菌肝脓肿伴内源性眼内炎者中近50%同时伴有糖尿病^[2]。糖尿病患者发生肝脓肿性眼内炎的概率是正常人的3.6~11倍,且与患者视力预后有关联^[3]。有研究发现糖化血红蛋白超过9%的肺炎克雷伯菌肝脓肿伴侵袭性感