

蒸馏水处理对体外人晶状体上皮细胞活性的抑制作用

张文文¹ 张荣沛² 刘亚军¹ 何自芳¹ 张司¹ 解正高¹

¹南京大学医学院附属鼓楼医院眼科, 南京 210008; ²大连医科大学研究生院, 大连 116044

张荣沛现为中山大学中山眼科中心博士研究生, 广州 510060

通信作者: 解正高, Email: zgxie87@163.com

【摘要】 目的 研究蒸馏水处理对体外培养的人晶状体上皮细胞(LECs)活性的影响。方法 收集 2020 年 5—12 月在南京大学医学院附属鼓楼医院确诊为年龄相关性白内障并行超声乳化白内障吸除联合人工晶状体植入术的患者 156 例 156 眼, 将手术过程中收集的晶状体前囊膜标本 156 片等分为 312 小片。采用计算机随机数法将其中 157 小片样本分为正常对照组 23 小片、阳性对照组 10 小片、平衡盐溶液(BSS)浸泡组 61 小片和蒸馏水浸泡组 63 小片, 其中正常对照组无任何处理; 阳性对照组直接用质量分数 4% 组织细胞固定液固定; BSS 浸泡组中 20 小片浸泡 1 min、21 小片浸泡 2 min、20 小片浸泡 3 min; 蒸馏水浸泡组中 20 小片浸泡 1 min、23 小片浸泡 2 min、20 小片浸泡 3 min。另选取 125 小片模拟白内障手术过程中的注吸过程, 按照上述 BSS 浸泡组和蒸馏水浸泡组处理相应时间后, 用装有 BSS 的瓶子在 70 cm 高度冲洗 1 min。采用锥虫蓝-伊红染色法检测细胞活力, 计算 LECs 密度、死亡数、死亡率及脱落百分率。将剩余小片分为正常对照组、BSS 浸泡组和蒸馏水浸泡 1、2、3 min 组, 其中 BSS 浸泡组浸泡 3 min, 其余分组处理同前, 光学显微镜和透射电子显微镜下观察各组 LECs 结构。结果 BSS 浸泡各组 LECs 边界清晰, 形态与正常对照组相比无明显差异。蒸馏水浸泡各组随时间延长, LECs 逐渐胀大, 死亡细胞边界不清。各组 LECs 密度、死亡数和死亡率总体比较差异均有统计学意义($F=13.459, 98.918, 130.600$, 均 $P<0.001$), 其中蒸馏水浸泡 2 min 和 3 min LECs 密度均低于正常对照组, 蒸馏水浸泡 1、2、3 min 组 LECs 死亡数和死亡率均高于正常对照组, 蒸馏水浸泡 1、2、3 min 组 LECs 死亡数和死亡率均高于 BSS 浸泡相同时长组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。正常对照组, BSS 浸泡 1、2、3 min 组和 BSS 浸泡联合冲洗组仅检测到少量 LECs 脱落。浸泡不同时间点, 蒸馏水浸泡联合冲洗组 LECs 脱落明显, 且随着蒸馏水浸泡时间的增加, LECs 脱落范围增大。各组 LECs 脱落百分率总体比较差异有统计学意义($F=123.670, P<0.001$), 其中蒸馏水浸泡组、蒸馏水浸泡联合冲洗组处理不同时间 LECs 脱落百分率均高于正常对照组, 蒸馏水浸泡组随处理时间延长 LECs 脱落百分率明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。光学显微镜下显示蒸馏水浸泡 1、2、3 min 组细胞破坏, 其中浸泡 2 min 和 3 min 组 LECs 部分脱落。透射电子显微镜下可见蒸馏水浸泡 1、2、3 min 组细胞溶解破坏, 亚细胞器肿胀, 细胞间连接破坏; 其中浸泡 1 min 和 2 min 组细胞与囊膜连接疏松, 浸泡 3 min 组 LECs 与囊膜部分分离。结论 蒸馏水浸泡可导致 LECs 死亡, 其作用强度呈时间依赖性, 蒸馏水浸泡联合冲洗可去除晶状体囊膜 LECs。

【关键词】 白内障; 晶状体; 上皮细胞; 蒸馏水; 细胞活力; 细胞毒性

基金项目: 南京市卫生科技发展专项重点项目 (ZKX-210-18); 江苏省卫生健康委重点项目 (ZD2022022)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220731-00355

Inhibitory effect of distilled water on viability of human lens epithelial cells *in vitro*

Zhang Wenwen¹, Zhang Rongpei², Liu Yajun¹, He Zifang¹, Zhang Si¹, Xie Zhenggao¹

¹Department of Ophthalmology, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China; ²Graduate School of Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Zhang Rongpei is a Ph. D. student at Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China
Corresponding author: Xie Zhenggao, Email: zgxie87@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effect of distilled water on the viability of human lens epithelial



cells (LECs) cultured *in vitro*. **Methods** A total of 156 anterior capsule specimens were collected from 156 patients (156 eyes) who were diagnosed with age-related cataract during phacoemulsification combined with intraocular lens implantation from May to December 2020 in Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School. The 156 specimens were divided into 312 small pieces. Of the 312 pieces, 157 pieces were divided into normal control group (23 pieces), positive control group (10 pieces), balanced salt solution (BSS) immersion group (61 pieces) and distilled water immersion group (63 pieces) using computer-generated random numbers. Normal control group received no treatment. Positive control group was directly fixed with a mass fraction of 4% histiocytes fixative solution. For the 61 pieces in BSS immersion group, 20 pieces were soaked for 1 minute, 21 pieces for 2 minutes, and 20 pieces for 3 minutes. For the 63 pieces in distilled water immersion group, 20 pieces were soaked for 1 minute, 23 pieces for 2 minutes, and 20 pieces for 3 minutes. Another 125 pieces were selected to simulate the cataract aspiration-irrigation according to the treatment in BSS immersion group and distilled water immersion group respectively, plus rinse in a bottle containing BSS at a height of 70 cm for 1 minute. Cell viability was detected by trypan blue-eosin staining. LECs density, dead cell count, cell death rate and percentage of shedding (%) were calculated. Of the remaining 30 pieces, every 15 pieces were divided into normal control group, BSS immersion group, and distilled water immersion for 1, 2 and 3 minutes groups, with 3 pieces in each group. BSS immersion group was immersed for 3 minutes, and the other four groups were treated as mentioned above, and the LECs structure of the four groups was observed by light microscopy and transmission electron microscopy. This study adhered to the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School (No. 2019-248-01). Written informed consent was obtained from each subject. **Results** The boundaries of LECs in BSS treatment groups were clear, and there was no significant difference in morphology compared with normal control group. With time increasing, LECs in distilled water treatment groups gradually swelled, and the boundaries of dead cells were not clear. There were significant differences in LECs density, dead LECs count and LECs mortality ($F = 13.459, 98.918, 130.600$; all at $P < 0.001$). The LECs density was lower in 2-minute and 3-minute distilled water treatment groups than in normal control group, showing statistically significant differences (both at $P < 0.05$). The dead LECs count and LECs mortality were higher in 1-minute, 2-minute and 3-minute distilled water treatment groups than in normal control group and BSS treatment groups for the same time, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). Only a few shed LECs were seen in normal control group, 1-minute, 2-minute and 3-minute BSS treatment groups, and BSS immersion combined rinse group. After different time of soaking, there were more shed LECs in distilled water immersion combined rinse group, and the range of LECs shedding increased with the extension of distilled water immersion. There was a significant difference in the shedding percentage of LECs among different groups ($F = 123.670, P < 0.001$). The shedding percentages of LECs at different time points were higher in distilled water immersion groups and distilled water immersion combined rinse groups than in normal control group, and the difference was statistically significant (all at $P < 0.05$). The shedding percentage of LECs increased significantly in distilled water immersion groups with the extension of immersion. Light microscopy showed that the cells were destroyed in 1-minute, 2-minute and 3-minute distilled water treatment groups, and some LECs shed in the 2-minute and 3-minute treatment groups. Transmission electron microscopy showed cell lysis and destruction, suborganelles swelling, disruption of intercellular junctions in 1-minute, 2-minute and 3-minute distilled water treatment groups, loose attachment between cells and capsule in the 2-minute and 3-minute treatment groups, and cell detachment from capsule in the 3-minute treatment group.

Conclusions Distilled water immersion leads to LECs death in a time-dependent manner, and distilled water immersion combined with rinse can remove LECs on the lens capsule.

[**Key words**] Cataract; Lens, crystalline; Epithelial cells; Distilled water; Cell survival; Cell toxicity

Fund program: Nanjing Health Science and Technology Development Special Key Project (ZKX-210-18); Key Project of Jiangsu Provincial Health Commission (ZD2022022)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220731-00355

晶状体囊膜混浊是白内障术后常见的并发症,其中前囊膜混浊可导致晶状体前囊收缩和人工晶状体

(intraocular lens, IOL) 偏移^[1],后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO) 可导致视力明显下降^[2]。



成人白内障术后 3~5 年 PCO 的发生率为 20%~30%^[3],儿童的晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)比成人的增生和迁移能力更强^[4],儿童白内障术后晶状体囊膜混浊的发生率接近 100%,对视力发育有严重影响^[5]。晶状体囊膜混浊的治疗方法主要是 Nd:YAG 激光囊膜切开或行囊膜切开术,前者相对简单,但术后仍有发生并发症的风险^[3,6],后者是一种侵入性方法。因此,预防白内障术后囊膜混浊的研究具有重要临床意义。研究认为,白内障术后囊膜混浊与手术创伤刺激引起晶状体周围和赤道部残留 LECs 的增生、迁移和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)有关^[7]。目前,预防白内障术后晶状体囊膜混浊的研究主要集中在 2 个方面:(1)抑制 LECs 的增生、迁移和 EMT,如白藜芦醇药物的应用等以及植入疏水性锐边 IOL 或厚的囊内开口环以抑制 LECs 向后囊的迁移^[8-10],但 LECs 仍残留在囊袋内,无法消除 PCO 发生的机制^[11];(2)采用药物和手术结合的方法,尽可能清除囊膜中残留的 LECs^[12-13]。然而,许多药物对眼内组织的潜在毒性作用限制了其临床应用^[14-15]。研究表明,蒸馏水局部应用的低渗透压特性可诱导晶状体囊膜上 LECs 溶解,而对眼内组织无化学毒性,且可通过平衡盐溶液(balanced salt solution, BSS)快速中和^[16],推测其具有预防白内障术后囊膜上残留 LECs 活性作用,但目前相关人体临床试验结果存在分歧,蒸馏水对 LECs 的影响及最佳作用时间也不完全清楚。本研究以年龄相关性白内障(age-related cataract, ARC)患者的分离前囊膜作为实验样本,探讨蒸馏水对 LECs 活性是否具有抑制作用及其联合 BSS 对 LECs 是否具有清除作用,为临床工作提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 晶状体囊膜标本的收集 纳入 2020 年 5—12 月在南京大学医学院附属鼓楼医院确诊为 ARC 并行超声乳化白内障吸除联合 IOL 植入术的患者 156 例 156 眼,于术中收集晶状体前囊膜组织标本。患者年龄 50~95 岁,平均(69.40±11.52)岁;男 81 例,女 75 例。纳入标准:(1)年龄≥50 岁;(2)最佳矫正视力≤0.3;(3)晶状体囊膜相对完整、直径为 5.0~5.5 mm。排除标准:(1)年龄<50 岁;(2)有眼部外伤史;(3)术中晶状体囊膜破碎;(4)晶状体囊膜直径<5.0 mm;(5)囊膜污染者;(6)有其他内眼手术史者。本研究遵循《赫尔辛基宣言》,研究方案经南京大学医学院附属

鼓楼医院伦理委员会批准(批文号:2019-248-01)。所有患者均了解本研究的方法和目的,同意获取其生物样本用于实验研究,并自愿签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 锥虫蓝染色液(C0040)、质量分数 4%组织细胞固定液(P1110)、质量分数 2.5% Gluta 固定液(P1126)(北京索莱宝科技有限公司);磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(Gibco 10010023)(上海麦克林生化有限公司);伊红染色液(R20570,上海源叶生物科技有限公司);BSS(美国 Alcon 公司);蒸馏水(灭菌注射用水)(上海信谊金朱药业有限公司);二甲苯(10023418)、无水乙醇(100092683)(上海国药集团化学试剂有限公司);钼酸(分析纯)、环氧树脂(Epon618)(美国 Sigma 公司)。计算机图像分析系统(OLYMPUS cellSens Entry)(日本奥林巴斯公司);OLYMPUS BX43 光学显微镜(南京奥力科学仪器有限公司);脱水机(Donatello,意大利 DIAPATH 公司);包埋机(JB-P5)、冻台(JB-L5)(武汉俊杰电子有限公司);病理切片仪(RM2016,上海 Leica 仪器有限公司);组织摊片机(KD-P,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);烤箱(GFL-230,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司);防脱载玻片(Servicebio)(北京索莱宝科技有限公司);透射电子显微镜(JEOL JEM-1010,日本电子公司);透射电子显微镜制样机(EM AMW,德国 LEICA 公司);超薄切片仪(POWERTOME XL,美国 RMC 公司);手术显微镜(德国 Zeiss 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 实验分组及处理 将术中收集到的前囊膜迅速于手术显微镜下分别等分为 2 小片,共计 312 片。(1)采用计算机取随机数法选取 157 片,并使用同种方法将其分为正常对照组 23 片、阳性对照组 10 片、BSS 浸泡组 61 片和蒸馏水浸泡组 63 片。正常对照组标本无任何处理;阳性对照组标本用 4%组织细胞固定液固定;BSS 浸泡组标本用 BSS 分别浸泡 1、2、3 min,分别为 20、21、20 片;蒸馏水浸泡组标本用蒸馏水分别浸泡 1、2、3 min,分别为 20、23 和 20 片,备用。(2)模拟白内障手术中的注吸(irrigation and aspiration, I/A)过程,采用计算机随机数法选取 125 片,以同种方法将其分为 BSS 浸泡组 63 片和蒸馏水浸泡组 62 片,其中 BSS 浸泡组中浸泡 1 min 者 20 片、浸泡 2 min 者 22 片、浸泡 3 min 者 21 片;蒸馏水浸泡组中浸泡 1 min 者 20 片、浸泡 2 min 者 22 片、浸泡 3 min 者 20 片。用装有 BSS 的瓶子在 70 cm 高度冲洗 1 min,备用。(3)另采用计算机随机数法选取 15 片,

以同种方法分为 5 个组, 每组 3 片, 其中正常对照组不做处理, BSS 浸泡组浸泡于 BSS 中 3 min, 蒸馏水浸泡组分别浸泡 1、2、3 min。处理后固定液固定 24 h 以上, 行苏木精-伊红染色, 于透射电子显微镜下观察。同样的分组及处理方法处理样本 15 片, 置入 4 °C 预冷的固定液中 4 °C 保存备用。

1.2.2 锥虫蓝-伊红染色法检测细胞活力 将处理的样本置于质量分数 0.04% 锥虫蓝溶液中 1 min; BSS 温和冲洗 2 次; 除阳性对照组外, 其余样本用组织细胞固定液固定 10 min, PBS 冲洗 3 min, 伊红染色 30 s; 自来水轻轻洗涤, 室温下干燥。细胞活力指标的计算: 1.2.1(1) 中的 157 个样本小片行锥虫蓝-伊红染色后于 40 倍光学显微镜下拼接成 1/2 囊膜大小并拍照, 400 倍光学显微镜下调整焦距, 确认细胞核并进行拍照, 以计算细胞核数目; 辨认细胞轮廓并拍照, 以计算细胞数目, 每组选择 10 个非重叠图像。采用 ImageJ 软件计算 LECs 密度 (个/mm²)、LECs 死亡数 (个/mm²) 和 LECs 死亡率 (%) (图 1A~D)。计算公式如下:

$$\text{LECs 密度 (个/mm}^2\text{)} = \frac{10 \text{ 张图像中每 mm}^2 \text{ 的细胞总数}}{0.005 \times 5 \times 10}$$

$$\text{LECs 死亡数 (个/mm}^2\text{)} = \frac{10 \text{ 张图像中蓝色细胞核数}}{400 \text{ 倍光镜下 } 10 \text{ 张图像总面积}}$$

$$\text{LECs 死亡率 (\%)} = \frac{\text{LECs 细胞死亡数}}{\text{LECs 细胞数}} \times 100\%$$

将 1.2.1(2) 中经蒸馏水或 BSS 浸泡的 125 个联合 BSS 冲洗的样本小片进行锥虫蓝-伊红染色, 40 倍光学显微镜下拍照, 采用 ImageJ 软件计算 LECs 脱落百分率 (%), LECs 脱落百分率 (%) = 1 - 处理后的 LECs 面积/囊膜总面积 × 100%。以同样方法计算 1.2.1(1) 中 157 个样本小片的 LECs 脱落百分率 (%) (图 1E~F)。

1.2.3 光学显微镜和透射电子显微镜下观察各组 LECs 结构

1.2.3.1 光学显微镜下观察各组 LECs 结构 将 1.2.1(3) 中的 15 个小片样本从固定液中取出, 在通风橱内用手术刀将组织修理平整, 将其与对应的标签匹配后置于脱水盒内, 于脱水机内依次进行梯度乙醇脱水: 体积分数 75% 乙醇 4 h, 85% 乙醇 2 h, 90% 乙醇 2 h, 95% 乙醇 1 h, 无水乙醇 I 30 min, 无水乙醇 II 30 min, 醇苯 5~10 min; 二甲苯 I 处理 5~10 min, 二甲苯 II 处理 5~10 min, 65 °C 条件下融化石蜡 I、II、III 分别 1 h, 于包埋机内, 先放入包埋框, 待蜡凝固之前将组织从脱水盒内取出, 按照包埋面的要求放入包埋框

并贴上对应的标签。于 -20 °C 冻台冷却, 蜡凝固后将蜡块从包埋框中取出并修整蜡块, 用石蜡切片片机切片, 厚度为 4 μm。切片漂浮于摊片机 40 °C 温水上, 将组织展平铺于载玻片, 60 °C 烤箱内烤片。水烤干蜡烤化后取出, 常温下保存。中性树胶封片, 光学显微镜下观察并摄片。

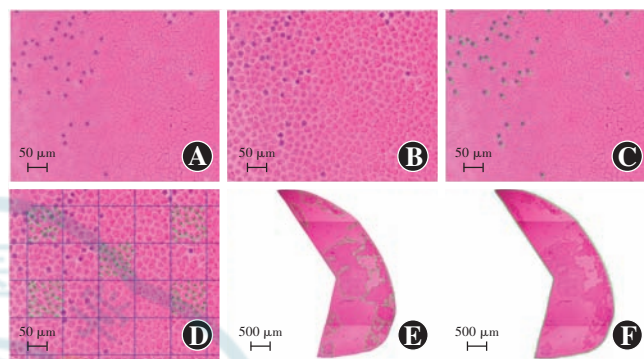


图 1 蒸馏水处理的 LECs 活性定量分析示意图 (锥虫蓝-伊红染色) A: 以看清细胞核为拍照要求, 计算细胞核数目 (×400, 标尺 = 50 μm) B: 以看清细胞轮廓为拍照要求, 计算细胞轮廓数目 (×400, 标尺 = 50 μm) C: 死亡 LECs 的数量计数 (×400, 标尺 = 50 μm) D: 计算 5 个正方形中的 LECs 数量 (×400, 标尺 = 50 μm) E: 绿色标示部分为剩余的 LECs 面积 (×40, 标尺 = 500 μm) F: 囊膜总面积 (×40, 标尺 = 500 μm)

Figure 1 Schematic diagram of quantitative analysis of distilled water-treated LECs activity (Trypanosoma blue-eosin staining) A: Count of nuclei (×400, bar = 50 μm) B: Count of cell contours (×400, bar = 50 μm) C: The number of dead LECs (×400, bar = 50 μm) D: Count of LECs in 5 squares (×400, bar = 50 μm) E: Remaining area of LECs (green-marked area) (×40, bar = 500 μm) F: Total area of the capsule membrane (×40, bar = 500 μm)

1.2.3.2 透射电子显微镜下各组 LECs 超微结构观察 取 1.2.1(3) 中处理好的剩余 15 片标本, 小心倒掉固定液, 用 0.1 mol/L、pH 7.0 的 PBS 漂洗 3 次, 每次 15 min。质量分数 1% 锇酸溶液固定样品 1~2 h, 用 PBS 漂洗样品 3 次, 每次 15 min。乙醇梯度脱水 (30%、50%、70%、80%、90%) 各 15 min, 用 100% 的乙醇处理 20 min, 纯丙酮处理 20 min。用体积比 1:1 的包埋剂与丙酮液的混合液处理样品 1 h, 体积比 3:1 的包埋剂与丙酮液的混合液处理样品 3 h, 纯包埋剂处理样品过夜, 将处理的样品包埋, 70 °C 加热过夜。以超薄切片机切片, 厚度为 70~90 nm, 经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50% 乙醇饱和溶液各染色 5~10 min, 晾干后透射电子显微镜下观察细胞的超微结构并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布, 以

$\bar{x} \pm s$ 表示,多组间评价指标的总体差异比较采用单因素方差分析;组间数据方差齐性评估采用 Levene 检验,方差齐者(单纯浸泡组各小组)组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,组间方差不齐者(浸泡联合冲洗组)两两比较采用 Games-Howell 检验。采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单纯浸泡处理后各组 LECs 存活情况比较

正常对照组前囊 LECs 呈规则的多边形,并有少量 LECs 死亡。阳性对照组所有细胞均死亡,视野内满布蓝色细胞核。BSS 浸泡各组 LECs 边界清晰,形态接近正常对照组。蒸馏水浸泡各组随时间延长 LECs 逐渐胀大死亡,细胞边界不清(图 2)。各组 LECs 密度、LECs 死亡数和 LECs 死亡率总体比较差异均有统计学意义($F = 13.459, 98.918, 130.600$, 均 $P < 0.001$),其中蒸馏水浸泡 2 min 和 3 min LECs 密度均低于正常对照组,蒸馏水浸泡 1、2、3 min 组 LECs 死亡数和死亡率均高于正常对照组,蒸馏水浸泡 1、2、3 min 组 LECs 死亡数和死亡率均高于 BSS 浸泡相同时长组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。随浸泡时间的延长,蒸馏水浸泡组 LECs 死亡数增多,死亡率逐渐升高(表 1)。

2.2 单纯浸泡及联合 BSS 处理后各组 LECs 脱落情况比较

正常对照组、BSS 浸泡组和 BSS 浸泡联合冲洗组仅检测到少量脱落的 LECs。蒸馏水浸泡联合冲洗组脱落 LECs 明显增多,且随着蒸馏水浸泡时间的延长

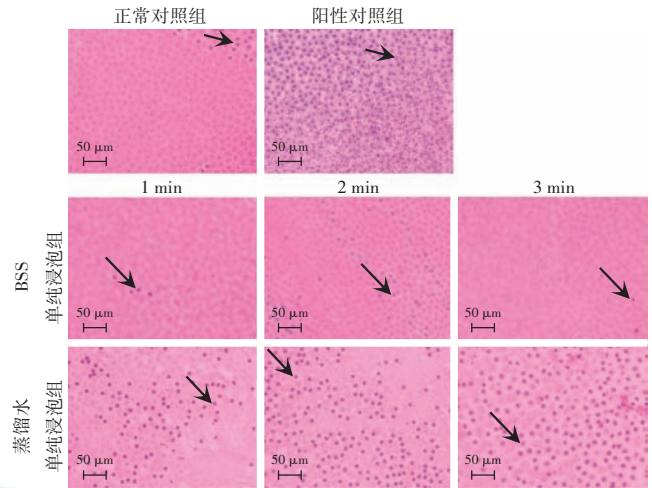


图 2 光学显微镜下各组细胞形态变化 (HE × 400, 标尺 = 50 μm)

正常对照组 LECs 呈规则多边形,并有少量 LECs 死亡(箭头);阳性对照组所有细胞均死亡,视野内满布蓝色细胞核;BSS 浸泡各组 LECs 边界清晰,形态接近正常;蒸馏水浸泡后各组 LECs 随时间延长逐渐胀大死亡 BSS:平衡盐溶液

Figure 2 Cell morphology of different groups under an optical microscope (HE × 400, bar = 50 μm) The LECs showed regular polygons in normal control group and a few cells died (arrows). All cells died in positive control groups with blue nuclei. The boundaries of LECs were clear in BSS immersion groups with a normal morphology. LECs gradually swelled and died in distilled water-treated groups BSS: balanced salt solution

脱落的 LECs 增多(图 3)。各组 LECs 脱落百分率总体比较,差异有统计学意义($F = 386.287, P < 0.001$),其中与正常对照组相比,蒸馏水浸泡 1min、2 min 和 3 min 及蒸馏水浸泡 1min、2 min 和 3 min 联合冲洗组的 LECs 脱落百分率明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$);BSS 浸泡 1 min、2 min 和 3 min 及 BSS

表 1 各组 LECs 存活情况比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of LECs viability among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	LECs 密度(个/mm ²)	LECs 死亡数(个/mm ²)	LECs 死亡率(%)
正常对照组	23	3 829.08 ± 519.16	263.01 ± 142.85	7.16 ± 4.28
BSS 浸泡 1 min 组	20	4 054.63 ± 489.64	280.99 ± 124.24	7.03 ± 3.14
BSS 浸泡 2 min 组	21	3 985.13 ± 687.90	292.07 ± 129.35	7.30 ± 2.76
BSS 浸泡 3 min 组	20	4 114.35 ± 503.56	318.49 ± 176.66	7.72 ± 4.02
蒸馏水浸泡 1 min 组	20	3 501.20 ± 281.99 ^{bed}	1 045.47 ± 496.70 ^{abcd}	29.82 ± 13.83 ^{abcd}
蒸馏水浸泡 2 min 组	23	3 329.59 ± 370.95 ^{abed}	1 667.40 ± 517.76 ^{abede}	50.51 ± 15.83 ^{abede}
蒸馏水浸泡 3 min 组	20	2 898.03 ± 845.04 ^{abedef}	1 956.27 ± 434.45 ^{abedef}	70.05 ± 15.40 ^{abedef}
F 值		13.459	98.918	130.600
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 BSS 浸泡 1 min 组比较,^b $P < 0.05$;与 BSS 浸泡 2 min 组比较,^c $P < 0.05$;与 BSS 浸泡 3 min 组比较,^d $P < 0.05$;与蒸馏水浸泡 1 min 组比较,^e $P < 0.05$;与蒸馏水浸泡 2 min 组比较,^f $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) LECs:晶状体上皮细胞;BSS:平衡盐溶液

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with 1-minute BSS treatment group, ^b $P < 0.05$; compared with 2-minute BSS treatment group, ^c $P < 0.05$; compared with 3-minute BSS treatment group, ^d $P < 0.05$; compared with 1-minute distilled water treatment group, ^e $P < 0.05$; compared with 2-minute distilled water treatment group, ^f $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) LECs: lens epithelial cells; BSS: balanced salt solution

浸泡 1 min、2 min 和 3 min 联合冲洗组间 LECs 脱落百分率比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。相同浸泡时间点浸泡联合冲洗组 LECs 脱落率明显高于蒸馏水浸泡组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 2)。

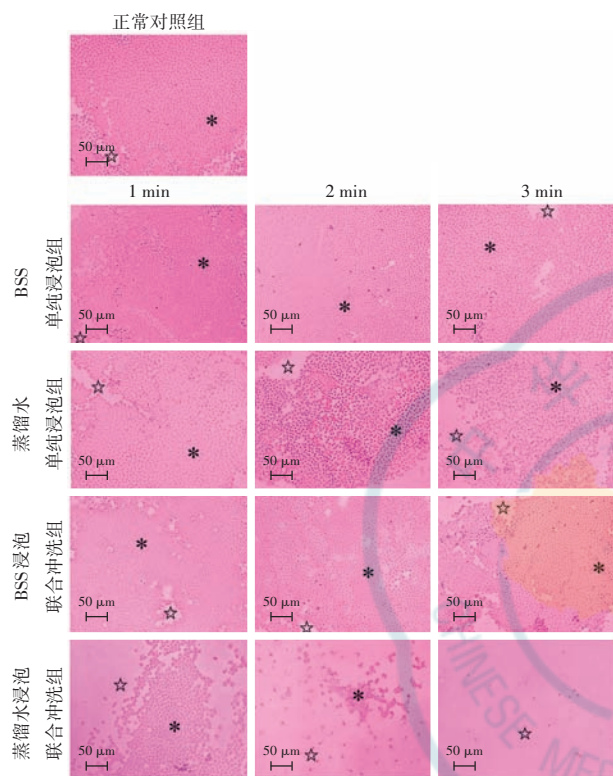


图 3 光学显微镜下各组 LECs 脱落情况 (HE $\times 400$, 标尺 = 50 μm) 正常对照组、BSS 浸泡组和 BSS 浸泡联合冲洗组仅检测到少量脱落 LECs。随着蒸馏水浸泡时间的延长,蒸馏水浸泡联合冲洗组 LECs 脱落增多 ☆:有 LECs 的区域; *:没有 LECs 的区域 BSS:平衡盐溶液

Figure 3 LECs shedding in different groups under an optical microscope (HE $\times 400$, bar = 50 μm) Only a few LECs were detected in normal control group, BSS immersion group and BSS immersion combined rinse group. With the increase of soaking time in distilled water, LECs shedding increased in distilled water immersion combined rinse group ☆: regions with LECs; *: regions without LECs BSS: balanced salt solution

2.3 各组 LECs 结构变化

2.3.1 光学显微镜下各组 LECs 结构变化 正常对照组和 BSS 浸泡 3 min 组中可见细胞形态规则及圆形细胞核的 LECs,细胞呈单层排列并贴附在囊膜上。蒸馏水浸泡 2 min 组和 3 min 组 LECs 的细胞完整性被破坏,细胞质流出,部分 LECs 脱落(图 4)。

2.3.2 透射电子显微镜下各组 LECs 结构变化 正常对照组和 BSS 浸泡 3 min 组 LECs 细胞结构完整,细胞核呈圆形或类圆形,核膜完整,核仁清晰,染色质分布均匀,亚细胞器形态正常,细胞间连接呈指状突起,

细胞呈单层排列,贴附于囊膜。蒸馏水浸泡 1 min 组和 2 min 组可见细胞溶解,细胞核形态尚规则,细胞质破坏,亚细胞器肿胀,细胞内物质流出细胞外,细胞间连接断裂,细胞与囊膜间贴附疏松。蒸馏水浸泡 3 min 组可见细胞内物质流出细胞外,细胞体积减小,细胞核变形并可见多处呈锐角状突起,细胞质破坏,亚细胞器肿胀,细胞间连接中断,细胞与囊膜部分分离(图 5)。

表 2 各组 LECs 脱落百分率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 2 Comparison of LECs shedding percentage among various groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	LECs 脱落百分率
正常对照组	23	11.04 ± 4.85
BSS 浸泡 1 min 组	20	10.88 ± 5.65 ^a
BSS 浸泡 2 min 组	21	11.43 ± 4.95 ^a
BSS 浸泡 3 min 组	20	18.80 ± 7.97 ^{bc}
蒸馏水浸泡 1 min 组	20	36.40 ± 15.83 ^{abcd}
蒸馏水浸泡 2 min 组	23	41.29 ± 17.55 ^{abcd}
蒸馏水浸泡 3 min 组	20	46.22 ± 18.88 ^{abcde}
BSS 浸泡联合冲洗 1 min 组	20	17.77 ± 10.25 ^{efg}
BSS 浸泡联合冲洗 2 min 组	22	19.81 ± 7.37 ^{abcdefg}
BSS 浸泡联合冲洗 3 min 组	21	19.07 ± 6.70 ^{abcdefg}
蒸馏水浸泡联合冲洗 1 min 组	20	60.02 ± 14.80 ^{abcdehijkl}
蒸馏水浸泡联合冲洗 2 min 组	22	81.31 ± 13.01 ^{abcdehijkl}
蒸馏水浸泡联合冲洗 3 min 组	20	94.12 ± 4.86 ^{abcdehijkl}
<i>F</i> 值		123.670
<i>P</i> 值		< 0.001

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.001$;与 BSS 浸泡 1 min 组比较,^b $P < 0.001$;与 BSS 浸泡 2 min 组比较,^c $P < 0.001$;与 BSS 浸泡 3 min 组比较,^d $P < 0.001$;与蒸馏水浸泡 1 min 组比较,^e $P < 0.001$;与蒸馏水浸泡 2 min 组比较,^f $P < 0.05$;与蒸馏水浸泡 3 min 组比较,^g $P < 0.05$;与 BSS 浸泡联合冲洗 1 min 组比较,^h $P < 0.05$;与 BSS 浸泡联合冲洗 2 min 组比较,ⁱ $P < 0.05$;与 BSS 浸泡联合冲洗 3 min 组比较,^j $P < 0.05$;与蒸馏水浸泡联合冲洗 1 min 组比较,^k $P < 0.05$;与蒸馏水浸泡联合冲洗 2 min 组比较,^l $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) LECs:晶状体上皮细胞; BSS:平衡盐溶液

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.001$; compared with 1-minute BSS treatment group, ^b $P < 0.001$; compared with 2-minute BSS treatment group, ^c $P < 0.001$; compared with 3-minute BSS treatment group, ^d $P < 0.001$; compared with 1-minute distilled water treatment group, ^e $P < 0.001$; compared with 2-minute distilled water treatment group, ^f $P < 0.05$; compared with 3-minute distilled water treatment group, ^g $P < 0.05$; compared with 1-minute BSS immersion combined rinse group, ^h $P < 0.05$; compared with 2-minute BSS immersion combined rinse group, ⁱ $P < 0.05$; compared with 3-minute BSS immersion combined rinse group, ^j $P < 0.05$; compared with 1-minute distilled water immersion combined rinse group, ^k $P < 0.05$; compared with 2-minute distilled water immersion combined rinse group, ^l $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) LECs: lens epithelial cells; BSS: balanced salt solution

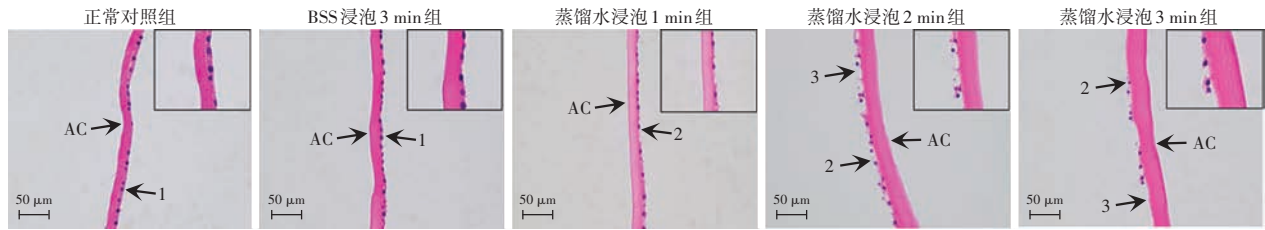


图 4 光学显微镜下各组 LECs 形态变化 (HE ×400, 标尺 = 50 μm) 蒸馏水浸泡 1、2 和 3 min 组细胞完整性破坏, 细胞内物质外流; 蒸馏水浸泡 2 min 和 3 min 组部分 LECs 脱落 AC: 前囊膜; 1: 正常 LECs; 2: 细胞溶解; 3: LECs 脱落 BSS: 平衡盐溶液

Figure 4 Morphological changes of LECs under an optical microscope (HE ×400, bar = 50 μm) Destruction of cell integrity and outflow of intracellular material were seen in 1-minute, 2-minute and 3-minute distilled water treatment groups. Some LECs were detached in 2-minute and 3-minute distilled water treatment groups AC: anterior capsule; 1: normal LECs; 2: cell lysis; 3: LECs detachment BSS: balanced salt solution

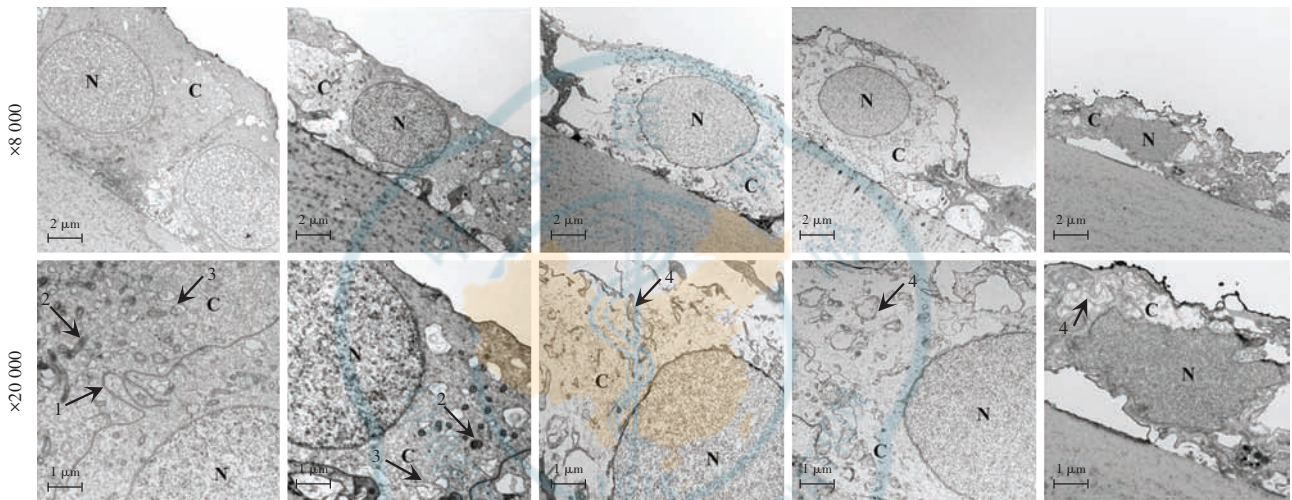


图 5 透射电子显微镜下各组 LECs 超微结构变化 (柠檬酸铅+醋酸双氧钨 ×8 000, 标尺 = 2 μm; ×20 000, 标尺 = 1 μm) 蒸馏水浸泡 1 min、2 min 组可见细胞溶解, 细胞核形态尚规则, 亚细胞器肿胀, 细胞间连接中断, 细胞与囊膜间附着疏松。蒸馏水浸泡 3 min 组细胞体积减小, 细胞核变形, 亚细胞器肿胀, 细胞间连接破坏, 部分细胞从囊膜上分离 N: 细胞核; C: 细胞质; 1: 正常 LECs 间连接呈指状突起; 2: 正常线粒体; 3: 正常溶酶体; 4: 细胞器肿胀

Figure 5 Ultrastructural changes of LECs under a transmission electron microscope (Lead citrate+Uranyl acetate ×8 000, bar = 2 μm; ×20 000, bar = 1 μm) Cell lysis, regular nuclear shape, subcellular organelle swelling, intercellular connection destruction, and loose attachment between cells and capsule were seen in 1-minute and 2-minute distilled water treatment groups. In 3-minute distilled water treatment group, cell volume shrink, nuclei deformation, subcellular organelle swelling, intercellular junctions destruction, and cell detachment from capsule were seen N: nucleus; C: cytoplasm; 1: finger-like protrusion of intercellular connection in normal LECs; 2: normal mitochondria; 3: normal lysosomes; 4: organelle swelling

3 讨论

蒸馏水可以通过低渗透诱导细胞肿胀破裂, 理论上降低细胞存活率。先前研究表明, 蒸馏水在体外对人眼离体前囊膜 LECs 处理 1 min 或 2 min 均可引起 LECs 胀破^[16]。用蒸馏水处理前囊膜 1 min 后, 细胞明显扩张, 偶见细胞溶解; 2 min 时, 质膜明显受损; 3 min 后, 所有 LECs 均出现裂解^[17]。但以上研究结果仅为显微镜下观察, 未能对蒸馏水破坏 LECs 的作用进行定量分析。

本研究采用锥虫蓝-伊红染色和显微镜下拍照对 LECs 密度、死亡数和死亡率进行了精确计算和定量分析, 更全面地评估了蒸馏水对 LECs 活性的影响^[18]。

活细胞具有排除锥虫蓝的完整细胞膜, 而死亡细胞则没有, 基于此原理, 锥虫蓝是常用的检测细胞活力的方法之一^[19-20]。苏木精-伊红染色适合于组织学分析, 伊红可以将细胞质染成红色, 清晰显示细胞轮廓^[21-22]。已发生白内障的 LECs 密度差异很大, 平均约为 4 000/mm²^[23]。本研究正常对照组 LECs 密度为 (3 829.08 ± 519.16) 个/mm², 与 Laspias 等^[23]的研究结论相似, 因此, 本研究计算方法可认为是可靠的。

本研究定量分析显示, 蒸馏水浸泡 3 min 后 LECs 死亡率约为 70.05%, 是蒸馏水浸泡 1 min 组的 2.35 倍, 这一结果与 Rekas 等^[24]的蒸馏水浸泡 3 min 有 70.8% 的细胞溶解结果相似。本研究同时设置了正常对照组及相同作用时间的 BSS 组与蒸馏水浸泡组进

行比较,结果表明在蒸馏水中浸泡 2 min 或 3 min 可有效导致 LECs 死亡,蒸馏水浸泡 3 min 的效果最好。但 Duncan 等^[25]的研究中,FHL124 细胞暴露于蒸馏水中 2 min 后有 50% 的细胞存活,这可能与实验方法和计数方法不同有关。Rabsilber 等^[26]研究认为,使用蒸馏水处理并不能显著减轻 PCO 的发展,与本研究结论不同。这可能是由于蒸馏水的作用时间不足造成的。

白内障手术过程中,需用 I/A 冲洗整个囊袋,以去除晶状体皮质和黏弹剂。因此,可考虑在吸除晶状体皮质后采用蒸馏水联合囊袋冲洗,既可以充分发挥蒸馏水对 LECs 的破坏作用,又可以将蒸馏水冲出囊袋,同时清除与囊膜连接松散的细胞。本研究中采用 70 cm 高处 BSS 冲洗囊膜 1 min 模拟白内障术中 I/A 操作,结果显示蒸馏水浸泡结合冲洗有助于 LECs 清除,最有效的暴露时间为 3 min。有研究认为 360° 前囊膜抛光并不能降低 PCO 的发生率^[27],这意味着单独的机械前囊膜抛光不能清除囊袋中的所有 LECs。而本研究结果显示低渗蒸馏水浸泡联合冲洗可以有效清除 LECs。

为使蒸馏水对眼内其他组织的危害降至最低,可能需要加用保护措施。密闭囊袋灌注装置可暂时封闭囊袋以保护眼内组织,并可将药液注入及冲洗出囊袋^[6]。Rekas 等^[28]在人眼白内障手术中吸除晶状体皮质后,借助密闭囊袋灌注装置将蒸馏水注入囊袋,停留 3 min 后冲洗囊袋,结果显示该方法可有效降低晶状体囊膜混浊发生率。但密闭囊袋灌注装置不适用于深前房或小瞳孔者^[26],不适合微切口(1.8 mm 或 2.2 mm)白内障手术^[12]。在去除细胞核和皮质抽吸后,Zhang 等^[12]在玻璃体切割机辅助下,用空气和黏弹剂维持前房并封闭囊袋,吸除晶状体皮质后向囊袋注入蒸馏水或 BSS,停留 3 min 后冲洗囊袋,术后随访发现 BSS 组患者部分发生晶状体囊膜混浊,而蒸馏水组患者无明显晶状体囊膜混浊形成。但此方法对手术设备要求高,难以在基层医院推广。蒸馏水浸泡联合冲洗可有效清除 LECs,从而预防术后 PCO 的发生,本课题组正在进行后续临床试验,并将介绍一种方便的给药方式,以便于该方法的广泛传播和利用。

细胞死亡有坏死和凋亡 2 种方式。坏死是指细胞受到物理、化学因素影响后的被动死亡,以细胞质膜和核膜破裂、细胞骨架和核纤层解体为特征。本研究结果显示,蒸馏水浸泡可导致 LECs 死亡并清除 LECs。采用苏木精-伊红染色后光学显微镜下观察结果显示,在蒸馏水浸泡 2 min 和 3 min 亚组中 LECs 细胞溶解被破坏和部分脱落。在 Rekas 等^[24]的研究中,显微

镜下可偶见基底膜和 LECs,与本研究光学显微镜下观察结果相同。透射电子显微镜下观察结果显示,蒸馏水浸泡组 LECs 破坏,蒸馏水浸泡 1 min 组和 2 min 组细胞与囊膜之间连接松散,蒸馏水浸泡 3 min 组 LECs 与囊膜部分分离。核固缩是细胞坏死的重要标志之一,可以在蒸馏水浸泡 3 min 组透射电子显微镜下观察到。在每个处理时间的蒸馏水组的光学显微镜和透射电子显微镜结果中可以观察到细胞质破坏和肿胀,这是细胞器坏死的另一个标志。因此,可以得出蒸馏水可以导致 LECs 坏死的结论。而且本研究结果表明,蒸馏水不仅可以导致 LECs 死亡,还可以使细胞与囊膜之间的连接变得松散,从而使 LECs 从囊膜上脱落。因此,蒸馏水浸泡组的细胞脱落百分率升高。这些组织细胞学表现与锥虫蓝-伊红染色结果显示的 LECs 脱落百分率的结果相一致。

本研究仍存在一定的局限性:(1)虽然蒸馏水可以导致 LECs 死亡,但还不足以清除所有 LECs;对此,我们考虑蒸馏水经常作为溶剂存在,是否可以尝试联合其他药物以更充分地破坏 LECs?(2)本研究结果显示冲洗可以提高细胞脱落百分率,但并不能达到百分之百,可能是因为冲洗过程中囊膜的部分折叠。(3)本研究的材料为前囊膜,而赤道部囊膜的 LECs 形态和功能与前囊膜并不相同^[29],因此,需要进一步的动物实验来探讨蒸馏水对赤道部囊袋 LECs 的清除效果。(4)蒸馏水处理后 LECs 的组织病理学改变显示细胞坏死,提示蒸馏水除低渗机制外还有其他作用机制。这些方面均有待进一步研究。

本研究证实蒸馏水处理后可导致 LECs 死亡,蒸馏水浸泡联合冲洗是清除 LECs 以预防白内障术后晶状体囊膜混浊的有效方法。蒸馏水处理后的细胞组织病理学变化提示细胞坏死是 LECs 死亡的原因之一。本研究结果为采用蒸馏水预防白内障术后晶状体囊膜混浊提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 张文文:设计实验、实施研究、采集数据、统计分析、文章撰写;张荣沛:设计实验、实施研究、采集数据、统计分析;刘亚军、何自芳、张司:实施研究、采集分析数据;解正高:设计实验、指导研究、对文章的知识性内容作批评性审阅

参考文献

- [1] Pérez-Vives C. Biomaterial influence on intraocular lens performance: an overview [J/OL]. J Ophthalmol, 2018, 2018: 2687385 [2022-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29736282/>. DOI: 10.1155/2018/2687385.
- [2] Chen HC, Lee CY, Sun CC, et al. Risk factors for the occurrence of visual-threatening posterior capsule opacification [J/OL]. J Transl

- Med, 2019, 17(1) : 209 [2022-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31221170/>. DOI: 10.1186/s12967-019-1956-6.
- [3] Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated [J]. Arch Ophthalmol, 2009, 127(4) : 555-562. DOI: 10.1001/archophthalmol.2009.3.
- [4] Zhang J, Hussain A, Yue S, et al. Osmotically induced removal of lens epithelial cells to prevent PCO after pediatric cataract surgery: pilot study to assess feasibility [J]. J Cataract Refract Surg, 2019, 45(10) : 1480-1489. DOI: 10.1016/j.jcrs.2019.04.034.
- [5] Trivedi RH, Wilson ME. Posterior capsule opacification in pediatric eyes with and without traumatic cataract [J]. J Cataract Refract Surg, 2015, 41(7) : 1461-1464. DOI: 10.1016/j.jcrs.2014.10.034.
- [6] Aslam TM, Devlin H, Dhillon B. Use of Nd: YAG laser capsulotomy [J]. Surv Ophthalmol, 2003, 48(6) : 594-612. DOI: 10.1016/j.survophthal.2003.08.002.
- [7] Fişuş AD, Findil O. Capsular fibrosis: a review of prevention methods and management [J]. Eye (Lond), 2020, 34(2) : 256-262. DOI: 10.1038/s41433-019-0723-5.
- [8] Smith A, Eldred JA, Wormstone IM. Resveratrol inhibits wound healing and lens fibrosis: a putative candidate for posterior capsule opacification prevention [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60(12) : 3863-3877. DOI: 10.1167/iiov.18-26248.
- [9] Schartmüller D, Schriefel S, Schwarzenbacher L, et al. Posterior capsule opacification and Nd: YAG laser rates with two hydrophobic acrylic single-piece IOLs [J]. Eye (Lond), 2020, 34(5) : 857-863. DOI: 10.1038/s41433-019-0569-x.
- [10] Pallikaris IG, Stojanovic NR, Ginis HS. A new endocapsular open ring for prevention of anterior and posterior capsule opacification [J]. Clin Ophthalmol, 2016, 10 : 2205-2212. DOI: 10.2147/OPHT.S106770.
- [11] Balendiran V, Werner L, Ellis N, et al. Uveal and capsular biocompatibility of a new hydrophobic acrylic microincision intraocular lens [J]. J Cataract Refract Surg, 2020, 46(3) : 459-464. DOI: 10.1097/j.jcrs.000000000000117.
- [12] Zhang Q, Huang L, Jin H, et al. Air/fluid-dropping technique for intracapsular distilled water application: a vitrectomy approach for selective targeting of lens epithelial cells [J]. Retina, 2019, 39(2) : 364-370. DOI: 10.1097/IAE.0000000000001944.
- [13] Nishi O, Nishi K, Hikida M. Removal of lens epithelial cells following loosening of the junctional complex [J]. J Cataract Refract Surg, 1993, 19(1) : 56-61. DOI: 10.1016/s0886-3350(13)80282-9.
- [14] Wertheimer C, Kueres A, Siedlecki J, et al. The intraocular lens as a drug delivery device for an epidermal growth factor-Receptor inhibitor for prophylaxis of posterior capsule opacification [J/OL]. Acta Ophthalmol, 2018, 96(7) : e874-e882 [2022-10-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29855160/>. DOI: 10.1111/aos.13759.
- [15] Sobol EK, Ahmad S, Ibrahim K, et al. Rapidly progressive streptococcus dysgalactiae corneal ulceration associated with erlotinib use in stage IV lung cancer [J/OL]. Am J Ophthalmol Case Rep, 2020, 18 : 100630 [2022-10-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32140616/>. DOI: 10.1016/j.ajoc.2020.100630.
- [16] Crowston JG, Maloof A, Healey PR, et al. Water modulation of lens epithelial cells during cataract surgery [J]. J Cataract Refract Surg, 2003, 29(12) : 2464-2465. DOI: 10.1016/j.jcrs.2003.10.016.
- [17] Crowston JG, Healey PR, Hopley C, et al. Water-mediated lysis of lens epithelial cells attached to lens capsule [J]. J Cataract Refract Surg, 2004, 30(5) : 1102-1106. DOI: 10.1016/j.jcrs.2004.01.028.
- [18] Vasavada AR, Cherian M, Yadav S, et al. Lens epithelial cell density and histomorphological study in cataractous lenses [J]. J Cataract Refract Surg, 1991, 17(6) : 798-804. DOI: 10.1016/s0886-3350(13)80415-4.
- [19] Kerschbaum HH, Tasa BA, Schürz M, et al. Trypan blue-adapting a dye used for labelling dead cells to visualize pinocytosis in viable cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2021, 55(S1) : 171-184. DOI: 10.33594/000000380.
- [20] Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke [J/OL]. Mol Neurodegener, 2011, 6(1) : 11 [2022-10-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21266064/>. DOI: 10.1186/1750-1326-6-11.
- [21] Cao K, Lei X, Liu H, et al. Polydatin alleviated radiation-induced lung injury through activation of Sirt3 and inhibition of epithelial-mesenchymal transition [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12) : 3264-3276. DOI: 10.1111/jcmm.13230.
- [22] Li J, Tu G, Zhang W, et al. CHBP induces stronger immunosuppressive CD127⁺ M-MDSC via erythropoietin receptor [J/OL]. Cell Death Dis, 2021, 12(2) : 177 [2022-10-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33579907/>. DOI: 10.1038/s41419-021-03448-7.
- [23] Laspas GA, Thomopoulou GH, Lazaris AC, et al. Cytomorphometric study of epithelial cells in normal and cataractous human lenses in relation with hyperglycemia [J]. Int Ophthalmol, 2016, 36(2) : 147-158. DOI: 10.1007/s10792-015-0082-6.
- [24] Rekas M, Kluś A, Stankiewicz A, et al. Lens epithelial cell damage after exposure to deionized water to prevent posterior capsule opacification after phacoemulsification: an *in vitro* study [J/OL]. Med Sci Monit, 2010, 16(3) : BR102-106 [2022-06-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20190675/>.
- [25] Duncan G, Wang L, Neilson GJ, et al. Lens cell survival after exposure to stress in the closed capsular bag [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(6) : 2701-2707. DOI: 10.1167/iiov.06-1345.
- [26] Rabsilber TM, Limberger IJ, Reuland AJ, et al. Long-term results of sealed capsule irrigation using distilled water to prevent posterior capsule opacification: a prospective clinical randomised trial [J]. Br J Ophthalmol, 2007, 91(7) : 912-915. DOI: 10.1136/bjo.2006.106468.
- [27] Sachdev GS, Soundarya B, Ramamurthy S, et al. Impact of anterior capsular polishing on capsule opacification rate in eyes undergoing femtosecond laser-assisted cataract surgery [J]. Indian J Ophthalmol, 2020, 68(5) : 780-785. DOI: 10.4103/ijo.IJO_1787_19.
- [28] Rekas M, Kluś A, Kosatka M. Sealed-capsule irrigation with distilled deionized water to prevent posterior capsule opacification—prospective, randomized clinical trial [J]. Curr Eye Res, 2013, 38(3) : 363-370. DOI: 10.3109/02713683.2012.748079.
- [29] Liu Z, Wang R, Lin H, et al. Lens regeneration in humans: using regenerative potential for tissue repairing [J/OL]. Ann Transl Med, 2020, 8(22) : 1544 [2022-06-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33313289/>. DOI: 10.21037/atm-2019-rcs-03.

(收稿日期:2022-07-31 修回日期:2023-04-24)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)