

· 实验研究 ·

吲哚菁绿对人晶状体上皮细胞生物学行为和转分化的抑制作用及其机制

刘亚军¹ 赵英迪² 张文文¹ 张司¹ 何自芳¹ 陈菲菲¹ 解正高¹

¹南京大学医学院附属鼓楼医院眼科,南京 210009;²皖南医学院解剖教研室,芜湖 241002

刘亚军、赵英迪对本文有同等贡献

通信作者:解正高,Email:zgxie87@163.com

【摘要】 目的 研究吲哚菁绿(ICG)对人晶状体上皮细胞(HLECs)生物学行为和转分化的抑制作用及其机制。方法 将 HLECs 细胞系分为空白对照组、5%葡萄糖溶液(GS)组和 0.5%、1.5%、2.5% ICG 组,分别用平衡盐溶液、5% GS 以及 0.5%、1.5%和 2.5%的 ICG 溶液处理 3 min,然后在新鲜培养基中孵育 24 h。采用流式细胞术检测 HLECs 凋亡水平;采用 Western blot 法检测 HLECs 凋亡相关蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤因子 2(Bcl-2)、半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)和 caspase-9 表达水平;采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)和 5-溴-2-脱氧尿嘧啶(EdU)法检测 HLECs 增生过程;采用细胞划痕实验检测 HLECs 迁移能力;采用 Transwell 法检测 HLECs 迁移和侵袭过程。采用 Western blot 法检测 HLECs 转分化相关蛋白 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、纤维连接蛋白(FN)和波形纤维蛋白(vimentin)表达水平。结果 空白对照组、5% GS 组、0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞凋亡率分别为(4.35±0.60)%、(4.63±0.19)%、(8.17±0.69)%、(13.90±0.33)%和(23.08±1.12)%,总体比较差异有统计学意义($F=412.74$, $P<0.05$),其中 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞凋亡率明显高于空白对照组和 5% GS 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。0.5% ICG 组、1.5% ICG 组、2.5% ICG 组 caspase-3、caspase-9 和 Bax 蛋白相对表达量明显高于空白对照组和 5% GS 组,1.5% ICG 组、2.5% ICG 组 Bcl-2 蛋白相对表达量较空白对照组和 5% GS 组降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组 EdU 阳性细胞率明显低于空白对照组和 5% GS 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。0.5% ICG 组、1.5% ICG 组、2.5% ICG 组细胞生存率明显低于空白对照组和 5% GS 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。细胞划痕实验结果显示,0.5% ICG 组、1.5% ICG 组、2.5% ICG 组细胞迁移率明显低于空白对照组和 5% GS 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。Transwell 实验结果显示,0.5% ICG 组、1.5% ICG 组、2.5% ICG 组细胞迁移数和侵袭细胞数明显少于空白对照组和 5% GS 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组 α -SMA、N-cadherin 和 FN 蛋白相对表达量明显低于空白对照组和 5% GS 组,1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组 vimentin 蛋白相对表达量较空白对照组和 5% GS 组降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 ICG 可促进 HLECs 凋亡,抑制其增生、迁移、侵袭和转分化,并呈浓度依赖性。

【关键词】 白内障;囊膜混浊;吲哚菁绿;晶状体上皮细胞;生物学行为;转分化

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.cn115989-20220817-00380

Inhibitory effect of indocyanine green on biological behavior and transdifferentiation of human lens epithelial cells and its mechanism

Liu Yajun¹, Zhao Yingdi², Zhang Wenwen¹, Zhang Si¹, He Zifang¹, Chen Feifei¹, Xie Zhenggao¹

¹Department of Ophthalmology, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210009, China; ²Department of Anatomy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

Liu Yajun and Zhao Yingdi contributed equally to the article

Corresponding author: Xie Zhenggao, Email: zgxie87@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of indocyanine green (ICG) on biological behavior

and transdifferentiation of human lens epithelial cells (HLECs) and its mechanism. **Methods** HLECs were divided into blank control group, 5% glucose solution (GS) group and 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG group, which were treated with balanced salt solution, 5% GS and 0.5%, 1.5% and 2.5% ICG solutions for 3 minutes, respectively, and then were incubated in fresh medium for 24 hours. The apoptosis level of HLECs was detected by flow cytometry. The expression levels of apoptosis-related proteins, Bcl-2-associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), caspase-3 and caspase-9 were detected by Western blot. Cell proliferation was detected via the cell counting kit-8 (CCK-8) assay and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation assay. The migration ability of HLECs was detected by cell scratch assay. Cell migration and invasion were determined by Transwell assays. The expression levels transdifferentiation-related proteins, α -smooth muscle actin (α -SMA), nerve calcium adhesion protein (N-cadherin), fibronectin (FN) and vimentin were assessed by Western blot. **Results** The apoptosis rates of blank control group, 5% GS group, 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG group were (4.35 ± 0.60)%, (4.63 ± 0.19)%, (8.17 ± 0.69)%, (13.90 ± 0.33)% and (23.08 ± 1.12)%, with a statistically significant difference in the overall comparison ($F = 412.74, P < 0.05$). The apoptosis rate was significantly higher in 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group (all at $P < 0.05$). The relative expressions of caspase-3, caspase-9 and Bax proteins were significantly higher in 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group, and the relative expression of Bcl-2 protein was lower in 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The rate of EdU-positive cells was significantly lower in 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG groups than in blank control group and 5% GS group (all at $P < 0.05$). The survival rate of cells was significantly lower in 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group (all at $P < 0.05$). The migration rates of scratch cells were significantly lower in 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The number of migrating cells and the number of invading cells were significantly lower in 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group (all at $P < 0.05$). The relative expressions of α -SMA, N-cadherin and FN were significantly lower in 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group, and the relative expression of vimentin was lower in 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). **Conclusions** ICG can promote HLECs apoptosis and inhibit HLECs proliferation, migration, invasion and transdifferentiation in a concentration-dependent manner.

[Key words] Cataract; Capsule opacification; Indocyanine green; Lens epithelial cells; Biological behavior; Transdifferentiation

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.cn115989-20220817-00380

据报道,在 5 年随访期内年龄相关性白内障术后后囊膜混浊 (posterior capsule opacification, PCO) 的发生率高达 22.6%^[1],在儿童患者中其发生率可高达 100%^[2]。PCO 的发生与白内障术中前囊膜及赤道部囊膜上残留的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 发生增生、迁移、侵袭和转分化为肌成纤维细胞、基质沉积和收缩有关^[3]。药物抑制 PCO 发病机制中的这些关键细胞事件似乎是预防 PCO 的一种有价值方法。目前临床工作中经常使用的治疗 PCO 的有效方法是 YAG 激光后囊切开术,但这种治疗方式可能

会损伤人工晶状体 (intraocular lens, IOL), 有发生黄斑囊样水肿、眼压升高和视网膜脱离的风险^[4-5]。近年来,通过抑制、清除或杀死残留 LECs 来减少 PCO 发生的各种药物已被广泛研究,其中抑制 LECs 增生的药物包括塞来昔布、氟尿嘧啶和西罗莫司^[6-8];阻碍迁移的药物包括甲氨蝶呤、厄洛替尼和微小 RNA-34a^[9-11];阻碍上皮-间质转分化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的药物包括山梨醇、白藜芦醇和 THZ1^[12-14];清除 LECs 的药物包括乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、蒸馏水和高

渗盐水^[15-17]。这些药物仍主要用于细胞和动物实验,尚未广泛应用于临床。因此,需要一种有效且安全的 PCO 预防药物。吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)在眼科临床上广泛用于荧光素眼底血管造影、内界膜染色和晶状体前囊染色^[18-19]。研究表明,0.50 mg/ml ICG 对 LECs 的活性影响很小;低于 0.075 mg/ml 时,ICG 对 LECs 活性无影响,0.06% ICG 孵育人视网膜色素上皮细胞(human retinal pigment epithelial cells, HRPEs)后 72 h,细胞存活率仍能接近 90%;0.062 5 mg/ml 和 0.02 mg/ml 的 ICG 均不会引起 RPE 细胞存活率的变化^[20-22]。然而,越来越多的细胞实验显示了高浓度 ICG 具有细胞毒性作用,0.25% 的 ICG 可使 HRPEs 存活率降至约 30%;ICG 浓度为 5 mg/ml 时,孵育时间超过 5 min,6 h 后细胞存活率明显下降,孵育 20 min 后无活 RPE 细胞^[22-24]。ICG 是否能够抑制人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, HLECs)的生物学行为尚不清楚。本研究拟观察 ICG 对 HLECs 生物学行为的抑制作用并探讨其机制,为 PCO 的预防方法研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 HLECs 细胞系 SRA01/04 购自上海通派生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);青霉素/链霉素(南京凯基生物有限公司);兔抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(14395-1-AP, 美国 Proteintech 公司);兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(ab32503)、兔抗凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤因子-2(B cell lymphoma/leukemia, Bcl-2)抗体(ab32124)、兔抗凋亡相关分子半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)抗体(ab2302)、兔抗凋亡相关分子 caspase-9(ab2324)、兔抗 N-钙黏蛋白(nerve calcium adhesion protein, N-cadherin)抗体(ab76011)、兔抗纤维连接蛋白(fibronectin, FN)抗体(ab2413)、兔抗波形纤维蛋白(vimentin)抗体(ab92547)、兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(ab8226)(美国 Abcam 公司);凋亡试剂盒(美国 Biologend 公司);5-溴-2'-脱氧尿嘧啶(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)试剂盒、细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8)、BCA 定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(羊抗兔 IgG-HRP)二抗(BK0027, 南京贝斯特生物技术有限公司);ICG(辽宁丹东怡创制

药有限公司);ECL Plus 发光试剂盒(上海翊圣生物技术有限公司);Transwell 细胞培养小室(上海赛默飞世尔科技公司)。垂直电泳系统(北京六一生物有限公司);凝胶成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司);CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 使用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 HLECs,每 3 天更换 1 次培养基,细胞生长融合至 80%~90% 时将其分为空白对照组、5% 葡萄糖溶液(glucose solution, GS)组和 0.5%、1.5%、2.5% ICG 组,分别采用平衡盐溶液、5% GS 及 0.5%、1.5% 和 2.5% ICG 溶液处理 3 min,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗 3 次,然后在新鲜培养基中孵育 24 h 备用。以下所有实验重复 3 次。

1.2.2 ICG 染料的制备 将 4 °C 避光瓶装保存的无菌 ICG 粉末溶解在 5% 葡萄糖水溶液中以获得 0.5%、1.5% 和 2.5% 的新鲜 ICG 溶液。2.5% (25 mg/ml) ICG 溶液配置:将 25 mg ICG 粉末溶解于 1 ml 5% GS 中,摇匀至绿色且无可见颗粒;1.5% (15 mg/ml) ICG 溶液配置:将 0.6 ml 2.5% ICG 溶液和 0.4 ml 5% GS 混合摇匀;0.5% (5 mg/ml) ICG 溶液配置:将 25 mg ICG 粉末溶解于 5 ml 5% GS 中,摇匀至绿色且无可见颗粒。

1.2.3 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平 收集各组细胞,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化并收集细胞,将细胞浓度调节至 1×10^5 /ml,用 PBS 洗 2 次,加入 500 μ l 结合缓冲液,在 500 μ l 结合缓冲液中加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀,加入 5 μ l 碘化丙啶,轻轻混匀并在 20~25 °C 下避光孵育 15 min,采用流式细胞仪在 488 nm 波长下于 1 h 内测试各组样品,并使用 CellQuest 分析结果。

1.2.4 Western blot 法检测凋亡和转分化相关蛋白的表达水平 各组分别加入 200 μ l RIPA 裂解物,在冰上充分裂解 15 min,离心半径 10 cm,12 000 r/min 离心 15 min,提取细胞总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总细胞蛋白含量,蛋白变性后加入到 10% 聚丙烯酰胺凝胶,并在 120 V 电压下电泳分离,在 200 mA 下将分离的蛋白质转印到 PVDF 膜上,PVDF 膜浸入含有 5% 脱脂牛奶的溶液中,在摇床上缓慢摇动,并在 20~25 °C 下封闭 2 h,加入 α -SMA、Bax、Bcl-2、caspase-3、caspase-9、N-cadherin、FN、vimentin 和 β -actin 一抗

(均 1:1 000 稀释), 4 ℃ 下孵育过夜; 清洗膜, 与羊抗兔或羊抗鼠二抗(1:2 000)在 20~25 ℃ 孵育 1 h; 采用 ECL 化学发光检测溶液曝光蛋白质条带, 并采用 ImageJ 图像分析软件测量条带灰度, 目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/ β -actin 灰度值。

1.2.5 CCK-8 法检测各组细胞增生率 取处于对数生长期的细胞制成 5×10^4 /ml 单细胞悬液, 取 96 孔板, 向每孔中加入 100 μ l 细胞悬液。各组分别采用 1.2.1 的方法处理细胞后, 分别在新鲜培养基中孵育 24、48、72 h, 将 10 μ l CCK-8 试剂添加到每个孔中, 37 ℃ 下孵育 2 h, 将 96 孔板放置在酶标仪中, 测定 450 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值。

1.2.6 EdU 法检测各组细胞增生率 按 1.2.1 细胞分组处理后, 去除细胞培养基, 用含有 50 μ mol/L EdU 的新鲜培养基培养细胞 2 h, 丙酮固定细胞 10 min, PBS 洗涤 5 min, 将细胞与含有 FITC 荧光素的 Apollo 反应缓冲液在黑暗中孵育 30 min, 将细胞与 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 一起孵育并固定, 使用激光扫描共聚焦荧光显微镜检测信号, 采用 ImageJ 软件计数阳性染色细胞。

1.2.7 细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力 将 HLECs 接种到 6 孔板中, 细胞融合至 60%~80% 时用不含血清的 DMEM/F12 培养基继续培养 18 h, 用 1 ml 枪头沿直线在每个孔的中心划线, 然后用 PBS 洗涤细胞 2 次。分别采用平衡盐溶液、5% GS 及 0.5%、1.5% 和 2.5% ICG 溶液处理细胞 3 min, PBS 洗 3 次, 在新鲜培养基中孵育。倒置显微镜下采集 0 h 和 48 h 时划痕区域的图像。采用 ImageJ 软件测量划痕面积, 划痕愈合率 = (划痕后 0 h 划痕面积 - 划痕后 48 h 划痕面积) / 划痕后 0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.2.8 Transwell 法检测各组细胞迁移能力以及侵袭能力 (1) 细胞迁移实验 采用 1.2.1 的方法分组处理细胞后继续培养 24 h, 重悬细胞, 于 Transwell 上室每孔接种 4×10^4 个细胞, 在无血清的 DMEM/F12 培养

基中培养, 下室培养液中含有 600 μ l 的 12% 胎牛血清作为趋化物质, 24 h 后用 PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 结晶紫染色 15 min, 待 Transwell 小室基底膜风干后显微镜下拍照, 采用 ImageJ 软件计数膜下的细胞数。(2) 细胞侵袭实验 将稀释的基质胶加入 Transwell 上室, 其余步骤与迁移实验一致。

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。各组不同测量指标总体比较采用单因素方差分析, 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 各组细胞形态比较

倒置显微镜下可见空白对照组及 5% GS 组细胞贴壁, 呈多边形及梭形, 相邻细胞呈聚集状态; 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞呈分散、收缩状态 (图 1)。

2.2 各组细胞凋亡率及凋亡蛋白相对表达量比较

空白对照组、5% GS 组、0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞凋亡率分别为 $(4.35 \pm 0.60)\%$ 、 $(4.63 \pm 0.19)\%$ 、 $(8.17 \pm 0.69)\%$ 、 $(13.90 \pm 0.33)\%$ 和 $(23.08 \pm 1.12)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 412.74, P < 0.05$), 其中 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞凋亡率较空白对照组和 5% GS 组明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), ICG 诱导 HLECs 凋亡呈浓度依赖性; 5% GS 组细胞凋亡率略高于空白对照组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2)。空白对照组、5% GS 组、0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组 caspase-3、caspase-9、Bax、Bcl-2 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 65.53、71.41、39.65、15.72$, 均 $P < 0.05$), 其中 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组、2.5% ICG 组 caspase-3、caspase-9 和 Bax

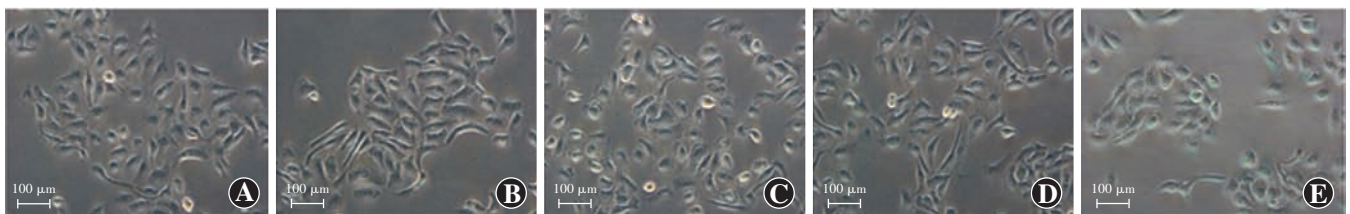


图 1 各组 HLECs 形态 ($\times 200$, 标尺 = 100 μ m) 空白对照组及 5% GS 组细胞贴壁, 形态呈多边形及梭形, 相邻细胞呈聚集状态; 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞呈分散、收缩状态 A: 空白对照组 B: 5% GS 组 C: 0.5% ICG 组 D: 1.5% ICG 组 E: 2.5% ICG 组

Figure 1 Morphology of HLECs in different groups ($\times 200$, bar = 100 μ m) In blank control group and 5% GS group, cells adhered to the wall and were polygonal and spindle-shaped, with adjacent cells clustered. In 0.5% ICG, 1.5% ICG and 2.5% ICG groups, cells were in a dispersed and contracted state A: blank control group B: 5% GS group C: 0.5% ICG group D: 1.5% ICG group E: 2.5% ICG group

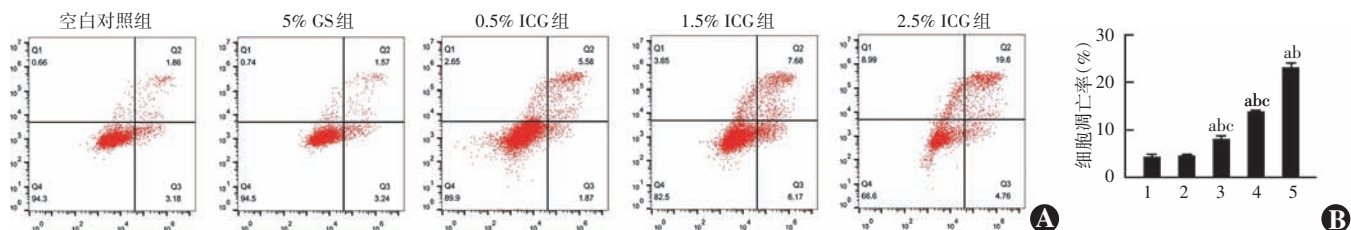


图 2 各组细胞凋亡情况比较 A: 各组细胞凋亡流式检测图 B: 各组细胞凋亡率比较 $F = 412.74, P < 0.05$. 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 5% GS 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 2.5% ICG 组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) 1: 空白对照组; 2: 5% GS 组; 3: 0.5% ICG 组; 4: 1.5% ICG 组; 5: 2.5% ICG 组 GS: 葡萄糖溶液; ICG: 吲哚菁绿

Figure 2 Comparison of cell apoptosis rate in different groups A: Flow cytometry of cell apoptosis in different groups B: Comparison of cell apoptosis rate among various groups $F = 412.74, P < 0.05$. Compared with blank control group, ^a $P < 0.05$; compared with 5% GS group, ^b $P < 0.05$; compared with 2.5% ICG group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 3$) 1: blank control group; 2: 5% GS group; 3: 0.5% ICG group; 4: 1.5% ICG group; 5: 2.5% ICG group GS: glucose solution; ICG: indocyanine green

蛋白相对表达量明显高于空白对照组和 5% GS 组, 1.5% ICG 组、2.5% ICG 组 Bcl-2 蛋白相对表达量较空白对照组和 5% GS 组降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 1.5% ICG 组与 2.5% ICG 组细胞凋亡相关蛋白相对表达量比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 3, 表 1)。

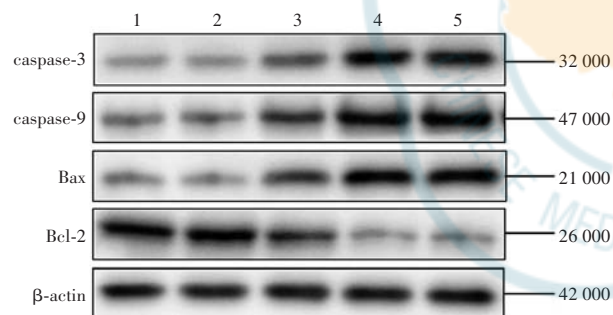


图 3 各组细胞凋亡相关蛋白 caspase-3、caspase-9、Bax、Bcl-2 表达电泳图 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组 caspase-3、caspase-9 和 Bax 蛋白条带灰度强度强于空白对照组和 5% GS 组; 1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组 Bcl-2 蛋白条带灰度强度弱于空白对照组和 5% GS 组; 1.5% ICG 组、2.5% ICG 组 caspase-3、caspase-9、Bax 和 Bcl-2 蛋白条带灰度强度无明显差异 1: 空白对照组; 2: 5% GS 组; 3: 0.5% ICG 组; 4: 1.5% ICG 组; 5: 2.5% ICG 组 caspase: 半胱氨酸蛋白酶; Bax: Bcl-2 相关 X 蛋白; Bcl: 凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤因子; β-actin: β-肌动蛋白

Figure 3 Electrophoretogram of caspase-3, caspase-9, Bax and Bcl-2 proteins expressions in different groups detected by Western blot

The grayscale intensity of caspase-3, caspase-9 and Bax proteins bands were stronger in 0.5% ICG, 1.5% ICG and 2.5% ICG groups than in blank control group and 5% GS group. The grayscale intensity of Bcl-2 protein band was weaker in 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group. There was no significant difference in the grayscale intensity of caspase-3, caspase-9, Bax and Bcl-2 proteins bands between 1.5% ICG group and 2.5% ICG group 1: blank control group; 2: 5% GS group; 3: 0.5% ICG group; 4: 1.5% ICG group; 5: 2.5% ICG group caspase: cysteinyl aspartate specific proteinase; Bax: Bcl-2 associated X protein; Bcl: B cell lymphoma/leukemia

2.3 各组细胞增生情况比较

EdU 实验结果显示, 空白对照组、5% GS 组、

0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组 EdU 阳性细胞率分别为 $(53.67 \pm 10.46)\%$ 、 $(51.92 \pm 7.61)\%$ 、 $(39.11 \pm 6.36)\%$ 、 $(18.92 \pm 2.94)\%$ 和 $(19.91 \pm 1.22)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 19.31, P < 0.05$), 其中 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组 EdU 阳性细胞率较空白对照组和 5% GS 组明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 5% GS 组 EdU 阳性细胞率略低于空白对照组, 2.5% ICG 组 EdU 阳性细胞率略高于 1.5% ICG 组, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 4A, B)。

CCK-8 实验结果显示, 空白对照组、5% GS 组、0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞 72 h 时生存率分别为 100%、 $(93.82 \pm 1.62)\%$ 、 $(71.2 \pm 3.46)\%$ 、 $(42.40 \pm 2.54)\%$ 和 $(35.60 \pm 3.51)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 74.20, P < 0.05$), 其中 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞生存率较空白对照组和 5% GS 组明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 2.5% ICG 组和 1.5% ICG 组细胞生存率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4C)。

2.4 各组细胞迁移和侵袭情况比较

细胞划痕实验结果显示, 空白对照组、5% GS 组、0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞迁移率分别为 $(88.80 \pm 8.70)\%$ 、 $(84.33 \pm 6.50)\%$ 、 $(63.67 \pm 13.87)\%$ 、 $(40.43 \pm 11.10)\%$ 和 $(39.23 \pm 3.33)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 18.50, P < 0.05$), 其中 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞迁移率较空白对照组和 5% GS 组明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 2.5% ICG 组和 1.5% ICG 组细胞迁移率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5)。

Transwell 实验结果显示, 与空白对照组及 5% GS 组相比, 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组迁移及侵袭细胞数减少 (图 6)。空白对照组、5% GS 组、

表 1 各组细胞中 caspase-3、caspase-9、Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of relative expression levels of caspase-3, caspase-9, Bax and Bcl-2 proteins among various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	caspase-3	caspase-9	Bax	Bcl-2
空白对照组	3	0.292±0.034	0.292±0.034	0.171±0.041	0.816±0.115
5% GS 组	3	0.296±0.029	0.286±0.016	0.183±0.047	0.812±0.134
0.5% ICG 组	3	0.478±0.048 ^{abc}	0.478±0.048 ^{abc}	0.377±0.100 ^{abc}	0.691±0.097 ^{bc}
1.5% ICG 组	3	0.769±0.054 ^{ab}	0.769±0.054 ^{ab}	0.769±0.072 ^{ab}	0.261±0.074 ^{ab}
2.5% ICG 组	3	0.803±0.046 ^{ab}	0.803±0.046 ^{ab}	0.810±0.072 ^{ab}	0.274±0.065 ^{ab}
F 值		65.53	71.41	39.65	15.72
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与 5% GS 组比较,^b $P<0.05$;与 2.5% ICG 组比较,^c $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) caspase:半胱氨酸蛋白酶;Bax:Bcl-2 相关 X 蛋白;Bcl:凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤因子;GS:葡萄糖溶液;ICG:吲哚菁绿

Note:Compared with blank control group,^a $P<0.05$; compared with 5% GS group,^b $P<0.05$; compared with 2.5% ICG group,^c $P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD- t test) caspase: cysteinyl aspartate specific proteinase;Bax: Bcl-2 associated X protein; Bcl: B cell lymphoma/leukemia; GS: glucose solution; ICG: indocyanine green

0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞迁移数和侵袭数总体比较差异均有统计学意义($F=78.50$ 、 24.85 ,均 $P<0.05$),其中 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞迁移和侵袭细胞数较空白对照组和 5% GS 组明显减少,差异均有统计学意义(均

$P<0.05$);2.5% ICG 组与 1.5% ICG 组细胞迁移数和细胞侵袭数比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$) (表 2)。
2.5 各组细胞转分化相关蛋白相对表达量比较
 空白对照组、5% GS 组、0.5% ICG 组、1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组细胞转分化相关蛋白 α -SMA、N-cadherin、FN、vimentin 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F=38.26$ 、 16.42 、 29.91 、 31.91 ,均 $P<0.05$),其中 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组、2.5% ICG 组 α -SMA、N-cadherin 和 FN 蛋白相对表达量较空白对照组和 5% GS 组降低,1.5% ICG 组、2.5% ICG 组 vimentin 蛋白相对表达量较空白对照组和 5% GS 组降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);1.5% ICG 与 2.5% ICG 组细胞转分化相关蛋白表达比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$) (图 7,表 3)。

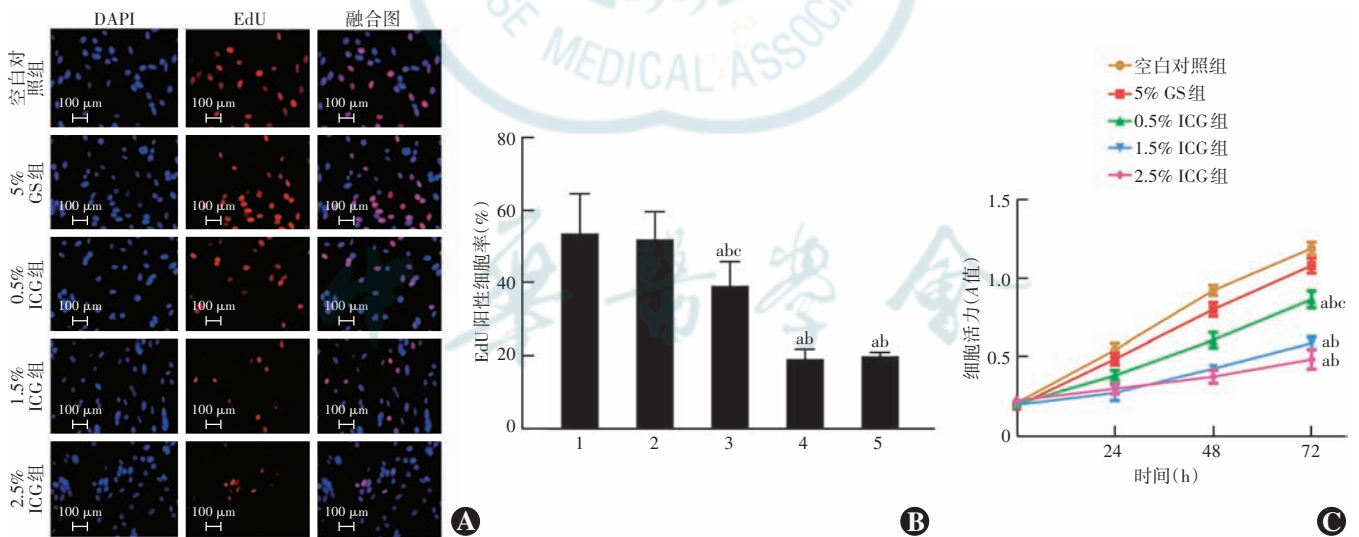


图 4 各组细胞增殖情况比较 A:各组细胞 EdU 染色图($\times 200$,标尺 = $100 \mu\text{m}$) B:各组细胞 EdU 阳性细胞率比较 $F=19.31$, $P<0.05$ 。与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与 5% GS 组比较,^b $P<0.05$;与 2.5% ICG 组比较,^c $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD- t 检验, $n=3$) 1:空白对照组;2:5% GS 组;3:0.5% ICG 组;4:1.5% ICG 组;5:2.5% ICG 组 C:各组细胞活力比较 $F=74.20$, $P<0.05$ 。与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与 5% GS 组比较,^b $P<0.05$;与 2.5% ICG 组比,^c $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD- t 检验, $n=3$) DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吲哚;EdU:5-溴-2-脱氧尿嘧啶;GS:葡萄糖溶液;ICG:吲哚菁绿

Figure 4 Comparison of cell proliferation in different groups A:EdU staining of cells in different groups ($\times 200$,bar = $100 \mu\text{m}$) B:Comparison of EdU-positive cell rate among various groups $F=19.31$, $P<0.05$. Compared with blank control group,^a $P<0.05$; compared with 5% GS group,^b $P<0.05$; compared with 2.5% ICG group,^c $P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n=3$) 1:blank control group; 2:5% GS group; 3:0.5% ICG group; 4:1.5% ICG group; 5:2.5% ICG group C:Comparison of cell viability among various groups $F=74.20$, $P<0.05$. Compared with blank control group,^a $P<0.05$; compared with 5% GS group,^b $P<0.05$; compared with 2.5% ICG group,^c $P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n=3$) DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; EdU: 5-ethynyl-2-deoxyuridine; GS: glucose solution; ICG: indocyanine green

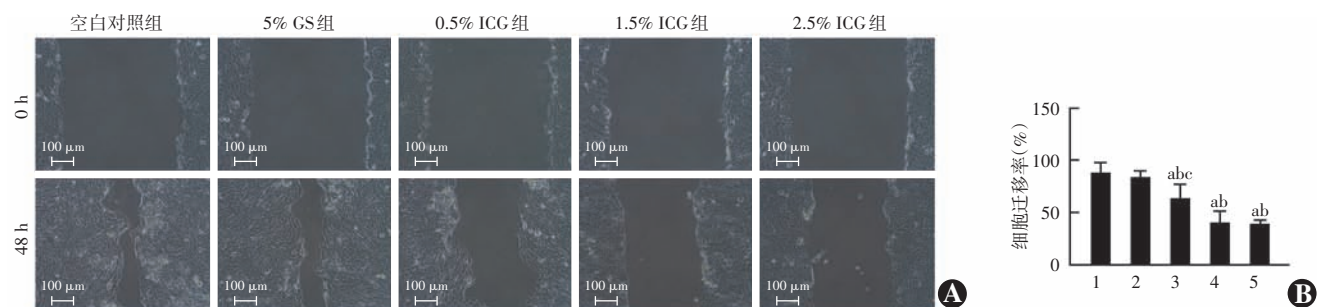


图5 各组细胞迁移情况比较 A:各组细胞0 h和48 h细胞划痕实验图($\times 100$,标尺=100 μm) B:各组细胞迁移率比较 $F=18.50, P<0.05$.与空白对照组相比,^a $P<0.01$;与5% GS组比较,^b $P<0.05$;与2.5% ICG组相比,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验, $n=3$) 1:空白对照组;2:5% GS组;3:0.5% ICG组;4:1.5% ICG组;5:2.5% ICG组 GS:葡萄糖溶液;ICG:吲哚菁绿

Figure 5 Comparison of cell migration rate among different groups A: Cell scratch assay at 0 and 48 hours in different groups ($\times 100$, bar = 100 μm) B: Comparison of cell migration rate among different groups $F=18.50, P<0.05$. Compared with blank control group, ^a $P<0.01$; compared with 5% GS group, ^b $P<0.05$; compared with 2.5% ICG group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n=3$) 1: blank control group; 2: 5% GS group; 3: 0.5% ICG group; 4: 1.5% ICG group; 5: 2.5% ICG group GS: glucose solution; ICG: indocyanine green

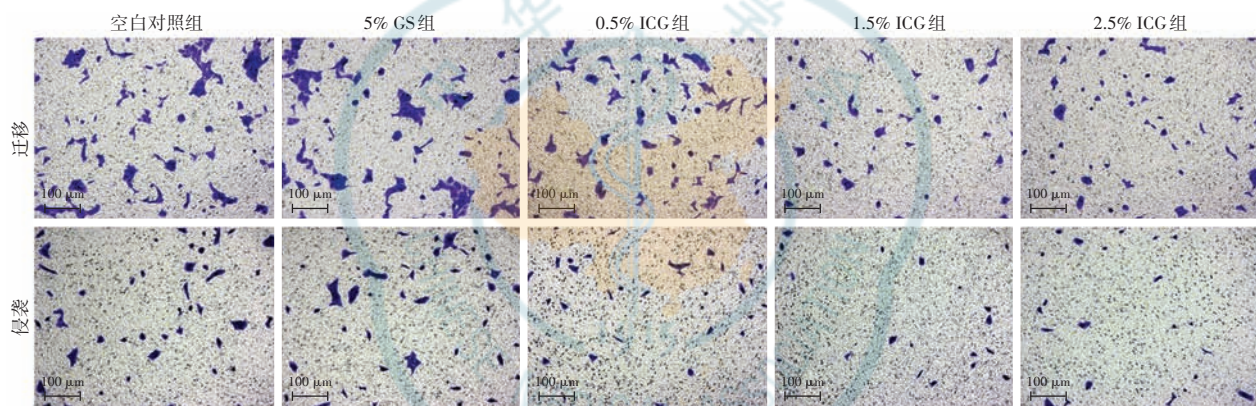


图6 各组细胞Transwell迁移和侵袭情况比较($\times 200$,标尺=100 μm) 与空白对照组及5% GS组相比,0.5% ICG组、1.5% ICG组和2.5% ICG组迁移及侵袭细胞数减少 GS:葡萄糖溶液;ICG:吲哚菁绿

Figure 6 Comparison of Transwell migration and invasion assay in different groups ($\times 200$, bar = 100 μm) Compared with blank control group and 5% GS group, the number of migrating and invading cells in 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG group were decreased GS: glucose solution; ICG: indocyanine green

表2 各组细胞迁移和侵袭细胞数比较($\bar{x}\pm s$,个)
Table 2 Comparison of the number of migrating and invading cells among various groups ($\bar{x}\pm s$, pcs)

组别	样本量	迁移细胞数	侵袭细胞数
空白对照组	3	126.78 \pm 5.11	68.33 \pm 8.18
5% GS组	3	125.22 \pm 5.97	69.78 \pm 7.74
0.5% ICG组	3	80.22 \pm 9.16 ^{abc}	42.33 \pm 6.55 ^{abc}
1.5% ICG组	3	53.33 \pm 4.19 ^{ab}	22.22 \pm 5.17 ^{ab}
2.5% ICG组	3	50.67 \pm 3.66 ^{ab}	19.44 \pm 6.27 ^{ab}
F值		78.50	24.85
P值		<0.05	<0.05

注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与5% GS组比较,^b $P<0.05$;与2.5% ICG组比较,^c $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) GS:葡萄糖溶液;ICG:吲哚菁绿

Note: Compared with blank control group, ^a $P<0.01$; compared with 5% GS group, ^b $P<0.05$; compared with 2.5% ICG group, ^c $P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD- t test) GS: glucose solution; ICG: indocyanine green

3 讨论

PCO是白内障术后患者视力逐渐下降的主要原因,而残留的LECs是导致视轴混浊的原因,所以术中杀死这些残留细胞可以减少PCO的发生。

Zhang等^[25]研究表明,ICG修饰IOL后,激光触发ICG-IOL可以诱导光动力疗法,能有效地抑制LECs的增生和迁移,而不会对远离LECs的其他细胞造成损伤,同时体内药效学 and 安全性研究表明,ICG-IOL能显著预防PCO的发生,对眼内正常组织是安全的。Melendez等^[21]研究发现LECs在0.1 mg/ml ICG中培养30 min后,用806 nm半导体激光照射1 min会显著降低细胞活性,当ICG质量浓度达到5 mg/ml时,仅有不到5%的LECs存活。本课题组先前的研究发现,0.5%、1.5%和2.5%的ICG作用于人晶状体囊膜后,

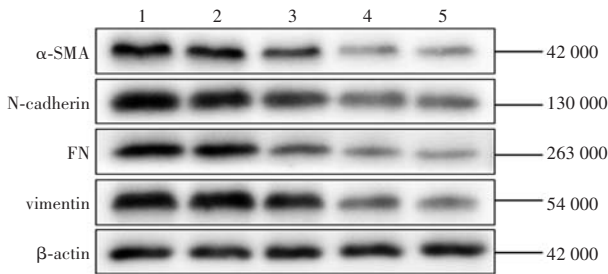


图 7 各组细胞转化相关蛋白 α -SMA、N-cadherin、FN、vimentin 表达电泳图 0.5% ICG 组、1.5% ICG 组、2.5% ICG 组 α -SMA、N-cadherin、FN 蛋白条带灰度强度弱于空白对照组和 5% GS 组；1.5% ICG 组、2.5% ICG 组 vimentin 蛋白条带灰度强度弱于空白对照组和 5% GS 组；1.5% ICG 组和 2.5% ICG 组 α -SMA、N-cadherin、FN、vimentin 蛋白条带灰度强度无明显差异 1: 空白对照组；2: 5% GS 组；3: 0.5% ICG 组；4: 1.5% ICG 组；5: 2.5% ICG 组 α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白；N-cadherin: N-钙黏蛋白；FN: 纤维连接蛋白；vimentin: 波形纤维蛋白； β -actin: β -肌动蛋白

Figure 7 Electrophoretogram of α -SMA, N-cadherin, FN and vimentin proteins expressions in different groups detected by Western blot The grayscale intensity of α -SMA, N-cadherin and FN proteins bands were weaker in 0.5% ICG group, 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group. The grayscale intensity of vimentin protein band was weaker in 1.5% ICG group and 2.5% ICG group than in blank control group and 5% GS group. There was no significant difference in the grayscale intensity of α -SMA, N-cadherin, FN and vimentin proteins bands between 1.5% ICG group and 2.5% ICG group 1: blank control group; 2: 5% GS group; 3: 0.5% ICG group; 4: 1.5% ICG group; 5: 2.5% ICG group α -SMA: α -smooth muscle actin; N-cadherin: nerve calcium adhesion protein; FN: fibronectin

表 3 各组细胞中 α -SMA、N-cadherin、FN 和 vimentin 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of relative expression levels of α -SMA, N-cadherin, FN and vimentin proteins among various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	α -SMA	N-cadherin	FN	vimentin
空白对照组	3	0.868 \pm 0.066	0.895 \pm 0.114	0.822 \pm 0.038	0.837 \pm 0.097
5% GS 组	3	0.874 \pm 0.064	0.896 \pm 0.095	0.834 \pm 0.047	0.875 \pm 0.086
0.5% ICG 组	3	0.611 \pm 0.111 ^{abc}	0.655 \pm 0.120 ^{abc}	0.619 \pm 0.086 ^{abc}	0.677 \pm 0.088
1.5% ICG 组	3	0.297 \pm 0.043 ^{ab}	0.321 \pm 0.093 ^{ab}	0.311 \pm 0.084 ^{ab}	0.301 \pm 0.034 ^{ab}
2.5% ICG 组	3	0.265 \pm 0.013 ^{ab}	0.311 \pm 0.080 ^{ab}	0.294 \pm 0.073 ^{ab}	0.267 \pm 0.028 ^{ab}
F 值		38.26	16.42	29.91	31.91
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与 5% GS 组比较,^b $P < 0.05$;与 2.5% ICG 组比较,^c $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白; N-cadherin: N-钙黏蛋白; FN: 纤维连接蛋白; vimentin: 波形纤维蛋白; GS: 葡萄糖溶液; ICG: 吲哚菁绿

Note: Compared with blank control group, ^a $P < 0.05$; compared with 5% GS group, ^b $P < 0.05$; compared with 2.5% ICG group, ^c $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) α -SMA: α -smooth muscle actin; N-cadherin: nerve calcium adhesion protein; FN: fibronectin; GS: glucose solution; ICG: indocyanine green

细胞存活率下降, 2.5% ICG 组 LECs 死亡率达 (33.11 \pm 2.16)%, 但具体机制尚不清楚^[26]。因此, 本次实验同样选取了 0.5%、1.5% 和 2.5% 浓度的 ICG 进行细胞实验, 通过研究 ICG 对 HLECs 生物学行为和转分化的抑制作用及其机制, 揭示 ICG 在治疗 PCO 中的潜在价值。

本研究发现, ICG 处理后的 HLECs 凋亡率升高, 增生、迁移和侵袭能力降低, 证实了 ICG 能诱导 HLECs 凋亡, 抑制细胞增生、迁移和侵袭。细胞凋亡涉及多种凋亡通路, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 通过抑制细胞色素 C 的释放来抑制细胞凋亡, 而促凋亡蛋白 Bax 通过与线粒体膜结合并允许细胞色素 C 的释放来诱导细胞凋亡^[27], 细胞色素 C 的释放促进 caspase-9 的激活, 进而激活 caspase-9 下游的 caspase, 导致细胞凋亡^[28]。本研究结果显示, 与空白对照组相比, ICG 组 Bax、caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达均明显增加, Bcl-2 蛋白表达减少, 可能最终导致 caspase 依赖的细胞凋亡。CCK-8、EdU 检测和细胞划痕实验表明, ICG 作用 3 min 后 HLECs 的生长立即受到影响。ICG 浓度越高, 对 HLECs 的损伤越大。PCO 的发生需要赤道部 LECs 向后囊中心迁移, 细胞划痕实验和 Transwell 实验表明, ICG 处理后 HLECs 的迁移和侵袭能力明显减弱, 这可以减缓 HLECs 向后囊的迁移速度, 进而延缓 PCO 的发生。

LECs 的 EMT 是 PCO 的主要病理过程, 形态学上表现为多边形的 LECs 变长呈梭形, 呈成纤维细胞样改变; 组织学典型表现为 α -SMA 表达增加, 同时伴有 N-cadherin、FN 和 vimentin 固有成分的表达增加^[29-30]。本研究结果显示, ICG 处理后 HLECs 中 α -SMA、N-cadherin、FN 和 vimentin 蛋白表达减少, 转分化作用被抑制。因此, ICG 可能通过调节间充质蛋白在 EMT 过程中发挥抑制作用。

临床中药物处理 LECs 的有效方法是直接向密封的囊袋内注射药物干预 HLECs, 可以直接精准干预到囊膜内表面的所有细胞, 但由于担心药物或化学物质渗出对角膜内皮细胞及其他眼内组织产生的毒性作用和不良反应, 目前已有相关密封囊口的方法报道, 这为今后 ICG 临床应用提供了保障。目前囊袋内给药方法主要有 2 种, 即白内障手术过程中吸除晶状体皮质后通过特殊设计的囊口密封装置或液-气交换后向囊袋内注射蒸馏水。Rabsilber 等^[31] 和 Rekas 等^[32] 尝试设计了囊口密封的硅胶装置, 手术过程中将其植入到前房, 下方的负压吸引环吸住前囊膜口的边缘囊膜, 下方的管道可向囊袋内灌注

蒸馏水。Zhang 等^[16]采用玻璃体切割机进行前房及囊袋内液-气交换,使前房及囊袋内保持空气状态下向囊袋内注入蒸馏水处理 HLECs,这些方法均取得了较好预防 PCO 的临床效果且未对临近组织结构造成损害,这为高浓度 ICG 溶液杀死细胞同时避免对周围组织造成损害提供了保障。

综上所述,本研究结果表明 ICG 可促进 HLECs 凋亡,抑制其增生、迁移、侵袭和转分化,并呈浓度依赖性,ICG 可能是一种非常有前途的预防 PCO 的药物。但本研究中 ICG 浓度梯度范围小,且未在动物及人体内验证 ICG 抑制 PCO 的有效浓度,今后将在人体内进行进一步的安全性及有效性研究。

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 刘亚军:实施研究、起草文章;赵英迪:采集数据、分析/解释数据;张文文:对文章知识性内容进行审阅;张司:统计分析;何自芳:文章修改;陈菲菲:图片制作及翻译;解正高:直接参与选题、酝酿和设计实验

参考文献

- Ursell PG, Dhariwal M, O'Boyle D, et al. 5 year incidence of YAG capsulotomy and PCO after cataract surgery with single-piece monofocal intraocular lenses: a real-world evidence study of 20 763 eyes [J]. *Eye (Lond)*, 2020, 34(5): 960-968. DOI: 10. 1038/s41433-019-0630-9.
- Knight-Nanan D, O'Keefe M, Bowell R. Outcome and complications of intraocular lenses in children with cataract [J]. *J Cataract Refract Surg*, 1996, 22(6): 730-736. DOI: 10. 1016/s0886-3350(96) 80312-9.
- Wormstone IM, Eldred JA. Experimental models for posterior capsule opacification research [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 142: 2-12. DOI: 10. 1016/j. exer. 2015. 04. 021.
- 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.
- 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.
- Davis JL, Yi NY, Salmon JH, et al. Sustained-release celecoxib from incubated acrylic intraocular lenses suppresses lens epithelial cell growth in an *ex vivo* model of posterior capsule opacity [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2012, 28(4): 359-368. DOI: 10. 1089/jop. 2011. 0196.
- Huang X, Wang Y, Cai JP, et al. Sustained release of 5-fluorouracil from chitosan nanoparticles surface modified intra ocular lens to prevent posterior capsule opacification: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013, 29(2): 208-215. DOI: 10. 1089/jop. 2012. 0184.
- Liu H, Zhang Y, Ma H, et al. Comparison of posterior capsule opacification in rabbit eyes receiving different administrations of rapamycin [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252(7): 1111-1118. DOI: 10. 1007/s00417-014-2656-9.
- Kassumeh SA, Wertheimer CM, von Studnitz A, et al. Poly (lactic-co-glycolic) acid as a slow-release drug-carrying matrix for methotrexate coated onto intraocular lenses to conquer posterior capsule opacification [J]. *Curr Eye Res*, 2018, 43(6): 702-708. DOI: 10. 1080/02713683. 2018. 1437455.
- Wertheimer C, Liegl R, Kernt M, et al. EGF receptor inhibitor erlotinib as a potential pharmacological prophylaxis for posterior capsule opacification [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2013, 251(6): 1529-1540. DOI: 10. 1007/s00417-013-2257-z.
- Feng D, Zhu N, Yu C, et al. MicroRNA-34a suppresses human lens epithelial cell proliferation and migration via downregulation of c-Met [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 495: 326-330. DOI: 10. 1016/j. cca. 2019. 04. 060.
- Chang KC, Shieh B, Petrash JM. Influence of aldose reductase on epithelial-to-mesenchymal transition signaling in lens epithelial cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 276: 149-154. DOI: 10. 1016/j. cbi. 2017. 01. 017.
- 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/iov. 18-26248.
- Ning J, Ma X, Long C, et al. Anti-tumor drug THZ1 suppresses TGFβ2-mediated EMT in lens epithelial cells via Notch and TGFβ/Smad signaling pathway [J]. *J Cancer*, 2019, 10(16): 3778-3788. DOI: 10. 7150/jca. 30359.
- Hazra S, Guha R, Jongkey G, et al. Modulation of matrix metalloproteinase activity by EDTA prevents posterior capsular opacification [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 1701-1711.
- 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.
- 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.
- Dada VK, Sharma N, Sudan R, et al. Anterior capsule staining for capsulorhexis in cases of white cataract: comparative clinical study [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2004, 30(2): 326-333. DOI: 10. 1016/S0886-3350(03)00573-X.
- Lochhead J, Jones E, Chui D, et al. Outcome of ICG-assisted ILM peel in macular hole surgery [J]. *Eye (Lond)*, 2004, 18(8): 804-808. DOI: 10. 1038/sj. eye. 6701328.
- Wu Y, Zhu W, Xu D, et al. Indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling in macular hole surgery: a meta-analysis [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48405 [2023-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23144875/>. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0048405.
- Melendez RF, Kumar N, Maswadi SM, et al. Photodynamic actions of indocyanine green and trypan blue on human lens epithelial cells *in vitro* [J]. *Am J Ophthalmol*, 2005, 140(1): 132-134. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2004. 12. 086.
- Hsu SL, Kao YH, Wu WC. Effect of indocyanine green on the growth and viability of cultured human retinal pigment epithelial cells [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2004, 20(4): 353-362. DOI: 10. 1089/1080768041725362.
- Peters S, Altwater A, Bopp S, et al. Systematic evaluation of ICG and trypan blue related effects on ARPE-19 cells *in vitro* [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 85(6): 880-889. DOI: 10. 1016/j. exer. 2007. 08. 024.
- Jackson TL, Hillenkamp J, Knight BC, et al. Safety testing of indocyanine green and trypan blue using retinal pigment epithelium and glial cell cultures [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(8): 2778-2785. DOI: 10. 1167/iov. 04-0320.
- Zhang Z, Huang W, Lei M, et al. Laser-triggered intraocular implant to induce photodynamic therapy for posterior capsule opacification prevention [J]. *Int J Pharm*, 2016, 498(1-2): 1-11. DOI: 10. 1016/j. ijpharm. 2015. 10. 006.
- He ZF, Zhao YD, Zhang S, et al. Indocyanine green reduces the viability of human lens epithelial cells and promotes cytolysis: an *ex vivo* study [J/OL]. *Transl Vis Sci Technol*, 2021, 10(13): 30 [2023-06-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8626857/>. DOI: 10. 1167/tvst. 10. 13. 30.
- Parone PA, James D, Martinou JC. Mitochondria: regulating the inevitable [J]. *Biochimie*, 2002, 84(2-3): 105-111. DOI: 10. 1016/s0300-9084(02)01380-9.
- Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(5): 405-413. DOI: 10. 1038/nrm2153.
- 徐庆, 李贞, 张慧. 慢病毒介导 miRNA-184 体外转染对人晶状体上皮细胞上皮间质转分化的影响 [J]. *中华眼科杂志*, 2015, 51(4): 295-300. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2015. 04. 012.
- Xu Q, Li Z, Zhang H. The influence of lentivirus-miRNA-184 on epithelial-mesenchymal transition of human lens epithelial cells *in vitro* [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2015, 51(4): 295-300. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2015. 04. 012.
- 董宁, 汤欣, 苑晓勇, 等. TAK1 促进人晶状体上皮细胞上皮间质转化的体外研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2016, 52(4): 278-284. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2016. 04. 009.
- Dong N, Tang X, Yuan XY, et al. TAK1 promotes epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2016, 52(4): 278-284. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2016. 04. 009.
- 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.
- Rekas M, Klus 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.

(收稿日期: 2023-06-10 修回日期: 2023-11-01)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

