

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.17.042

NF- κ B 和 TGF- β 1 在超声乳化术治疗的白内障患者结膜上皮细胞中的表达及其意义 *

甘露^{1,2} 封郭生² 吴之坤² 周炼红^{1,Δ}

(1 武汉大学人民医院眼科 湖北 武汉 430060; 2 荆门市中医医院眼科 湖北 荆门 430060)

摘要 目的:探讨 NF- κ B 和 TGF- β 1 在超声乳化术治疗的白内障患者结膜上皮细胞中的表达及其意义。方法:选取我院眼科收治的白内障患者 24 例,共 24 眼,且均接受超声乳化白内障摘除术和后房型人工晶状体植入术治疗。在治疗前和治疗后 15 天、30 天,采用免疫组织化学法检测患者结膜上皮细胞中 NF- κ B 和 TGF- β 1 的表达,并进行泪液分泌试验、荧光素染色、泪膜破裂时间和泪河高度测量四项检查。结果:Nf- κ B 和 TGF- β 1 呈现先增强后减弱的趋势,与术前相比,术后 15 天患者 NF- κ B 和 TGF- β 1 染色程度显著增强,差异具有统计学意义, ($P<0.05$);与术后 15 天比较,术后 30 天 NF- κ B 和 TGF- β 1 染色程度减弱,差异具有统计学意义, ($P<0.05$);与术前相比,术后 15 天泪膜破裂时间较术前明显缩短,荧光素染色明显增强;与术前相比,术后 30 天四项检查结果无差异, $P>0.05$ 。结论:超声乳化手术可提高白内障患者结膜上皮细胞中 NF- κ B 和 TGF- β 1 的表达,与术后眼膜的炎症反应有关。

关键词: 超声乳化术;泪膜;NF- κ B;TGF- β 1

中图分类号: R776.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)17-3353-04

Expressions and Significance of NF- κ B and TGF- β 1 in the Conjunctival Epithelial Cells of Patients with Phacoemulsification*

GAN Lu^{1,2}, FENG Guo-sheng², WU Zhi-kun², ZHOU Lian-hong^{1,Δ}

(1 Department of Ophthalmology, people's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China;

2 Department of Ophthalmology, Jingmen Hospital of traditional Chinese medicine, Jingmen, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of NF- κ B and TGF- β 1 in phacoemulsification for treatment of conjunctival epithelial cells in cataract patients. **Methods:** 24 cases of cataract patients were selected, a total of 24 eyes, were treated with phacoemulsification and posterior chamber intraocular lens implantation. Detected NF- κ B and TGF- β 1 expression by immunohistochemistry in conjunctiva epithelial cells, and check Schirmer test, fluorescein staining, tear film break-up time and lacrimal river height measurement. **Results:** NF- κ B and TGF- β 1 presents the trend of increased and then decreased, compared with the preoperative, postoperative 15 days in patients with NF- κ B and TGF- β 1 was significantly increased, ($P<0.05$); Compared with operation after 15 days, the expression of NF- κ B TGF- β 1 staining degree decreased, ($P<0.05$); Compared with the preoperative, postoperative 15 day tear break-up time was significantly shorter, fluorescein staining was significantly enhanced, ($P<0.05$); Compared with the preoperative, postoperative 30 days four checking results of no significant difference, $P>0.05$. **Conclusion:** Ultrasonic emulsification surgery can improve the patients NF- κ B and TGF- β 1 expression positive rate, associated with postoperative retinal inflammation, affect the stability of the film ACTS.

Key words: Phacoemulsification; Tear film; NF- κ B; TGF- β 1

Chinese Library Classification(CLC): R776.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)17-3353-04

前言

老年性白内障是由于老化、遗传、局部营养障碍、免疫及代谢异常等原因而引起的一种晶状体代谢紊乱,从而导致晶状体蛋白质变性,引起视力残疾性疾病^[1]。本病临床表现为非玻璃体性病变,眼前有飞蚊,视力呈武装模糊感,中心暗点扩大等视力问题。本病多发于 40 岁以上人群,据调查统计,我国白内障患者的患病率约为 24%。现代医学多采取白内障囊内摘出法、白内

障超声乳化等疗法治疗白内障,但副作用较多。研究发现,患者术后会出现干燥感、异物感、灼烧感,可能与手术破坏了眼膜的稳定性,泪膜的结构或功能异常及眼表面上皮的炎症和增生有关。本研究通过观察超声乳化对白内障患者结膜上皮细胞中 NF- κ B 和 TGF- β 1 表达的影响,旨在探讨其与泪膜变化的关系,现将结果报道如下。

1 资料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30225044)

作者简介:甘露(1979-),女,副主任医师,本科,研究方向:研究眼部疾病的治疗, E-mail: drop_lulu@163.com

Δ 通讯作者:周炼红(1968-),女,主任医师,博士,研究方向:研究眼部疾病的治疗

(收稿日期:2015-01-29 接受日期:2015-02-26)

1.1 一般资料

选取 2014 年 3 月至 2014 年 9 月于我院以白内障为诊断而收入院的患者 24 例,所有患者均在我院接受超声乳化白内障摘除术和后房型人工晶状体植入术治疗。其中,男 13 例(13 只眼),女 11 例(11 只眼),平均年龄(67 ± 7.23)岁,接受治疗的眼睛包括右眼 14 例,左眼 10 例。手术方法采取同轴微切口(2.5 mm),人工晶状体袋状植入,超声乳化仪使用美国眼力健公司 AMO Diplomax 型产品,术后患者未出现并发症,术后给予妥布霉素地塞米松滴眼液,1-7 天,每天 12 次,8-14 天,每天 6 次,14 天后,每天 4 次。

1.2 诊断标准

单侧或双侧发病,两眼发病可有先后,视力进行性下降,可由于玻璃体浑浊出现屈光不正,出现眩光感和复视,临床分为皮质性白内障、核性白内障和后囊下白内障。

1.3 纳入及排除标准

符合《职业性白内障诊断标准及处理原则》的诊断标准;年龄 45-80 周岁;患者自愿参与实验,并签署知情同意书;排除不配合实验、过敏体质、有药物过敏、肝炎、结核、艾滋病等传染病史、精神异常、肝肾功能障碍者。

1.4 检查方法

于术前、术后 15 天、术后 30 天对患者进行泪液分泌试验、荧光素染色、泪膜破裂时间和泪河高度测量四项检查,Schirmer I 试验采用美国博士伦标准的 5 mm×35mm Whatman 型滤纸,测量患者在 5 min 内不滴表面麻醉剂情况下的滤纸湿长;角膜荧光素染色用 2%消毒的荧光素钠液,用玻璃棒一端蘸少许放入患者结膜囊内,一分钟后用无菌生理盐水轻轻冲洗结膜囊,将角膜划分为四个象限,根据染色程度和面积记录分数,每个象限为 1-3 分,总分为 1-12 分;泪膜破裂时间采用秒表记录;泪河高度测量采用相干光断层扫描仪(AS-OCT)测量下方泪河

高度。以上试验均由同一医生于上午进行监测。

1.5 实验方法

1) 分别于术前、术后 15 天和术后 30 天用印记细胞法取材,嘱患者尽量向鼻侧注视,1%的盐酸氧普鲁卡因进行表面麻醉一分钟,用无菌的乙酸纤维素薄膜(10 mm×15 mm)轻放在患者颞侧球结膜表面,用玻璃棒轻压 3-5 s 后取出。2) 将标本放入含有 2-4 mL 的 DMEM 高糖培养液中,震荡 3 min 后,取出后,用 800 r/min 的离心机离心 1min,弃上清液,取 AnnexinV/PI 染色盒试剂,加入 2 μ L AV-FTTC 和 100 μ L Hepes buffer,在 24℃ 室温下进行孵化 10-15 min。再用 800 r/min 的离心机离心 1 min,弃上清液,加入 2 μ L AV-FTTC 和 100ulHepes buffer,在 24℃ 室温下进行孵化 10-15 min。上 EPICS ELITE 流式细胞仪进行检测,打印结果。3) 采用过氧化物酶标记的链霉菌抗生物素蛋白免疫组织化学染色(streptavidin peroxidase conjugated method,SP)法。一抗为 NF- κ B 兔抗人 IgG 多抗(北京博美科生物技术发展中心,sc-372)和 TGF- β 1 兔抗人 IgG 多抗(北京博美科生物技术发展中心,sc-146)稀释度为 1:200。二抗为生物素化的 IgG,三抗为辣根过氧化物酶标记的卵白素。SP 试剂盒为北京绿源博德生物科技有限公司。阴性对照以磷酸盐缓冲液(PBS)取代一抗完成;阳性对照为乳腺癌标本。以 DAB 酶底物显示剂(北京绿源博德生物科技有限公司)显色,Mayer 苏木素复染,常规脱水、透明后封片。日本 Topcon 光学显微镜下观察结果,Nikon 相机及 Kodak 胶卷摄影。

1.6 染色结果的评定标准

① 细胞膜和等离子体观察可见清晰的边界,无特定染色,表达为 "-";② 细胞膜和等离子体观察可见轻微的具体染色,呈浅棕色,表达为 "+";③ 细胞膜和等离子体观察可见温和的特异性着色,呈淡棕色,表达为 "++";④ 细胞膜和等离子体观察可见较深色泽,呈棕色,表达为 "+++"。如表 1。

表 1 染色结果的评定标准

Table 1 The evaluation standard of staining results

Evaluation	Cell membrane/plasma	Degree of staining
-	Clear boundary, no specific staining	no
+	Mild specific coloring	Shallow brown
++	Moderate specificity coloring	Pale brown
+++	Significant coloring	Pale brown

1.7 统计学方法

采用统计学软件 SPSS19.0 进行统计学分析,计量资料采用 t 检验,计数资料采用卡方检验处理,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 超声乳化术前后结膜上皮细胞 NF- κ B 和 TGF- β 1 表达的

变化

NF- κ B 和 TGF- β 1 主要表达于结膜上皮细胞的胞浆中。二者在结膜上皮细胞呈现一个先上升,后下降的趋势。与治疗前相比,术后 15 天 NF- κ B 和 TGF- β 1 表达阳性率较高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与术后 15 天相比,术后 30 天 NF- κ B 和 TGF- β 1 表达阳性率较低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 超声乳化术前后结膜上皮细胞中 NF- κ B 表达的变化

Table 2 Changes of the NF- κ B expression in conjunctival epithelial cells before and after phacoemulsification

Time	Number of eyes	The staining degree of NF- κ B			
		- (%)	+ (%)	++ (%)	+++ (%)
Before operation	24	6(25.00)	8(33.33)	4(16.67)	3(12.50)
15 days after operation	23	0(0)	5(21.73)	7(30.43)	12(52.18)
30 days after operation	23	7(30.43)	9(37.5)	3(13.04)	4(17.39)

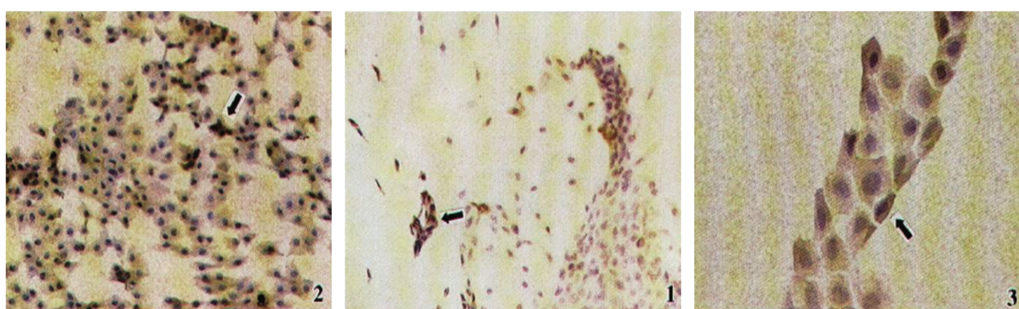


图1 结膜上皮细胞中 NF-κB 表达

Fig.1 expression of NF-κB in Conjunctival epithelial cells

表3 超声乳化术前后结膜上皮细胞中 TGF-β1 表达的变化

Table 3 Changes of the TGF-β1 expression in conjunctival epithelial cells before and after phacoemulsification

Group	Number of eyes	The staining degree of TGF-β1			
		- (%)	+ (%)	++ (%)	+++ (%)
Before operation	24	7(29.17)	10(41.67)	4(16.67)	3(12.50)
15 days after operation	23	0(0.00)	8(34.78)	7(30.43)	8(34.78)
30 days after operation	23	6(26.08)	14(60.86)	2(8.70)	1(4.35)

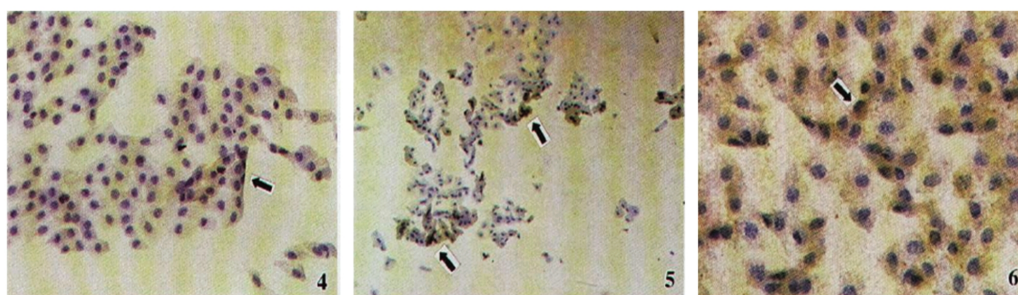


图2 结膜上皮细胞中 TGF-β1 表达

Fig.2 Expression of TGF-β1 in Conjunctival epithelial cells

表4 超声乳化术前后四项检查结果的比较

Table 4 Comparison of the clinical test data before and after phacoemulsification

Group	Tear secretion test(mm)	Fluorescein staining(grades)	Tear breakup time(s)	Tear meniscus height measurement(mm)
Before operation	11.549± 7.816	3.114± 2.887	9.625± 7.664	0.305± 0.108
15 days after operation	10.456± 6.876	5.165± 2.642*	6.962± 4.792*	0.278± 1.124
30 days after operation	11.157± 5.192	2.567± 2.693	9.824± 7.035	0.284± 0.114

Note: Compared with before, *P<0.05.

2.2 超声乳化术前后四项检查结果的比较

术后 30 天, 泪液分泌试验和泪河高度已基本恢复到术前水平, 泪膜破裂时间较术前明显缩短, 荧光素染色明显增强, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。术后 30 天, 以上四项指标基本恢复至术前水平, 与术前比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

泪膜均匀的分布于结膜囊, 形成一层 6-10 毫微米的薄膜, 分为粘液层、水样层和脂质层三层。水样层占泪膜的 98%, 能保持角膜和结膜的湿润; 脂质层主要是防止水样的泪液直接与空气接触, 减少水分的蒸发。当泪膜的任何一层被破坏, 失去原有的稳定性, 都会引起干眼症。有研究表明, 干眼症的主要原因是免疫的炎症反应、细胞凋亡、神经调节异常和激素水平的变化

等。乳化术和角膜屈光手术均可引起泪膜的稳定性异常, 角膜屈光术引起的干眼症与泪膜的感知减退有关, 而乳化术引起干眼症的机制尚不清楚。有研究表明, 眼表面的炎症与增生是引起泪膜变化的重要原因。

NF-κB 是具有转录激活功能的蛋白质, 存在与胞浆中, 在接受刺激信号时被活化进入细胞核中, 迅速激活炎症因子和免疫因子等细胞反应的目的因子, 主要参与炎症、免疫和急性期反应过程, 较其他炎症因子能更较好的反映炎症程度。TGF-β1 是一种具有多向生物效应的细胞调节因子, 可调节细胞外基质, 促进成纤维细胞增生以及拮抗抗炎细胞因子等。TGF-β1 作为功能细胞因子, 与很多疾病的发生有密切关系。

本研究结果显示超声乳化术后 15 天, 结膜细胞中 NF-κB 和 TGF-β1 的表达均明显增强, 尤其是 TGF-β1, 同时泪液分泌

试验、荧光素染色、泪膜破裂时间、泪河高度测量均有所降低,术后 NF- κ B 和 TGF- β 1 表达均恢复到术前,其他四项检查也基本与术前水平相同,表明术后干眼症也与眼膜的炎症与增生有密切关系。研究发现眼表面上皮的炎症和增生,尤其是炎症是引起泪膜异常的重要因素。那么,影响超声乳化术后泪膜变的机制是否也与术后眼表面上皮的炎症和增生相关?相关性研究发现,结膜上皮细胞中 NF- κ B 和 TGF- β 1 的表达程度能够反映泪膜的异常程度,其中 NF- κ B 的染色程度越高,角膜荧光素染色越多,BUT 越短;TGF- β 1 的表达越强,角膜荧光素染色越多,schirmer I 越少。眼表面上皮的炎症和增生对泪膜的影响是通过改变上皮细胞黏蛋白的分泌而起作用的。黏蛋白层是泪膜中重要的组成成分,是泪膜得以形成的首要条件。它厚 0.02-0.50 mm,由眼表面上皮细胞分泌。手术后结膜上皮细胞中 NF- κ B 和 TGF- β 1 的表达明显增强,表明上皮细胞的生物学活性已发生了变化,这无疑会影响到黏蛋白层的分泌。此外,手术后眼表上皮的脱失和手术切口的炎性水肿可引起角膜表面的不规则,使水化黏蛋白层无法均匀分布于眼表面,引起泪膜稳定性下降。由于泪膜与眼表上皮是相互影响的因此,超声乳化白内障摘出术后眼表面上皮的炎症和炎症状态下的增生可能是影响手术后泪膜变化的主要机制。

综上所述,超声乳化术后眼膜表面的炎症与增生是影响泪膜稳定性的重要因素,故在手术过程中尽量减少对眼膜的创伤,术后积极进行抗炎治疗,减轻眼部的炎症反映和增生,能有效的提高泪膜的稳定性,减少术后干眼症的发生。

参考文献(References)

- [1] Grzybowski A, Ascaso FJ, Kupidura-Majewski K. Continuation of anti-coagulant and antiplatelet therapy during phacoemulsification cataract surgery[J]. Current opinion in ophthalmology, 2015, 26(1): 28-33
- [2] Cohen MN, Intili A, Ni N. Femtosecond laser-assisted cataract surgery in residency training [J]. Current opinion in ophthalmology, 2015, 26 (1):56-60
- [3] Koo EB, Hou J, Han Y. Effect of glaucoma tube shunt parameters on cornea endothelial cells in patients with Ahmed valve implants[J]. Cornea, 2015, 34(1): 37-41
- [4] Ho JW, Afshari NA. Advances in cataract surgery: preserving the corneal endothelium [J]. Current opinion in ophthalmology, 2015, 26 (1):22-27
- [5] Kuganasan S, Loo AV, Subrayan V. A rare occurrence of epithelial inclusion iris cyst after phacoemulsification[J]. Clinical & experimental optometry, 2015, 98(1):97-98
- [6] Garcia-Gutierrez S, Quintana JM, Aguire U. Impact of clinical and patient-reported outcomes on patient satisfaction with cataract extraction[J]. Health expectations, 2014, 17(6): 765-775
- [7] Hayashi K, Yoshida M, Yoshimura K. Effect of steepest-meridian clear corneal incision for reducing preexisting corneal astigmatism using a meridian-marking method or surgeon's intuition[J]. Journal of cataract and refractive surgery 2014, 40(12): 2050-2056
- [8] Sykakis E, Karim R, Kinsella M. Study of fluid ingress through clear corneal incisions following phacoemulsification with or without the use of a hydrogel ocular bandage: a prospective comparative randomised study[J]. Acta ophthalmologica, 2014, 92(8): e663-666
- [9] Ronquillo CC, Zaugg B, Stagg B. Determining optimal torsional ultrasound power for cataract surgery with automatic longitudinal pulses at maximum vacuum ex vivo [J]. American journal of ophthalmology, 2014, 158 (6):1262-1266.e2
- [10] Nahum Y, Busin M. Quadruple procedure for visual rehabilitation of endothelial decompensation following phakic intraocular lens implantation [J]. American journal of ophthalmology, 2014, 158 (6): 1330-1334.e1
- [11] Widder RA, Dinslage S, Rosentreter A. A new surgical triple procedure in pseudoexfoliation glaucoma using cataract surgery, Trabectome, and trabecular aspiration[J]. Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology, 2014, 252(12): 1971-1975
- [12] Lockington D, Wang EF, Patel DV. Effectiveness of cataract phacoemulsification with toric intraocular lenses in addressing astigmatism after keratoplasty [J]. Journal of cataract and refractive surgery, 2014, 40(12): 2044-2049
- [13] Moon SW, Lim SH, Lee HY. Accuracy of biometry for intraocular lens implantation using the new partial coherence interferometer, AL-scan[J]. Korean journal of ophthalmology, 2014, 28 (6): 444-450
- [14] Kim MH, Hwang HS, Park KJ. Introduction of lens-angle reconstruction surgery in rabbit eyes[J]. Korean journal of ophthalmology, 2014, 28(6): 486-492
- [15] Wong MM, Shukla AN, Munir WM. Correlation of corneal thickness and volume with intraoperative phacoemulsification parameters using Scheimpflug imaging and optical coherence tomography [J]. Journal of cataract and refractive surgery, 2014, 40(12): 2067-2075
- [16] Kumar DA, Agarwal A, Sivagnanam S. Aqueous reaction quantification after phacoemulsification: Fourier-domain optical coherence tomography versus slitlamp biomicroscopy [J]. Journal of cataract and refractive surgery, 2014, 40(12): 2082-2090
- [17] Alder BD, Donaldson KE. Comparison of 2 techniques for managing posterior polar cataracts: Traditional phacoemulsification versus femtosecond laser-assisted cataract surgery [J]. Journal of cataract and refractive surgery, 2014, 40(12): 2148-2151
- [18] Aose M, Matsushima H, Mukai K. Influence of intraocular lens implantation on anterior capsule contraction and posterior capsule opacification [J]. Journal of cataract and refractive surgery, 2014, 40(12): 2128-2133
- [19] Chan TC, Li EY, Yau JC. Application of anterior segment optical coherence tomography to identify eyes with posterior polar cataract at high risk for posterior capsule rupture [J]. Journal of cataract and refractive surgery, 2014, 40(12): 2076-2081
- [20] Kohl JC, Werner L, Ford JR. Long-term uveal and capsular biocompatibility of a new accommodating intraocular lens [J]. Journal of cataract and refractive surgery, 2014, 40(12): 2113-2119