

文章编号:1004-7220(2010)03-0190-05

利用后巩膜加固术治疗家兔近视眼后 成纤维细胞生物力学性能变化

田海霞¹, 王超英², 陈维毅³, 王国辉³, 张全有³

(1. 河北医科大学 研究生学院, 石家庄 050017;

2. 中国人民解放军白求恩国际和平医院 眼科, 石家庄 050082;

3. 太原理工大学 应用力学与生物医学工程研究所, 太原 030024)

摘要:目的 研究后巩膜加固术后家兔眼球不同时期成纤维细胞力学特性的变化,从生物力学的角度探讨后巩膜加固术的作用机制。**方法** 3周龄新西兰家兔45只随机选取一侧眼球用眼睑缝合方法制备近视动物模型,建模60天后,眼球随机分为两组,A组行后巩膜加固术(PSR),B组行相似手术(不放置加固条带)。分别于术后3个月和6个月取材培养培养巩膜加固区及过渡组织的成纤维细胞。用免疫细胞化学法对培养的细胞进行鉴定。利用微管吸吮方法结合半无限体细胞力学模型测定各组成纤维细胞的力学特性(包括成纤维细胞的平衡弹性模量 E_0 和表观黏性 μ)。**结果** 经统计学分析,两组巩膜成纤维细胞的平衡弹性模量及表观黏性均无统计学意义($P > 0.05$)。后巩膜加固术6个月,经统计学分析,两组巩膜成纤维细胞的平衡弹性模量及表观黏性均无统计学意义($P > 0.05$)。后巩膜加固术后3月组与6月组的巩膜成纤维细胞比较, E_0 和 μ 的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。后巩膜加固术后3个月与6个月组的过渡区成纤维细胞的力学特性, E_0 分别为 (289.2 ± 84.3) , (276.9 ± 113.9) Pa; μ 分别为 $(1\ 575.2 \pm 459)$ Pa·s, $(1\ 492.2 \pm 562.6)$ Pa·s,其差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 后巩膜加固术的增强作用并不是原位巩膜成纤维细胞本身生物力学的加强,而是由于加固条带及引起过渡区的存在。

关键词: 近视;后巩膜加固术;细胞培养;巩膜成纤维细胞;微管吸吮;弹性模量;表观黏性

中图分类号: Q66 文献标志码: A

Biomechanical properties of fibroblasts after posterior scleral reinforcement treatment for rabbit experimental myopia

TIAN Hai-xia, WANG Chao-ying, CHEN Wei-yi, WANG Guo-hui, ZHANG Quan-you(1. Graduate College of HeBei Medical University, Shijiazhuang 050017, China. 2. Department of Ophthalmology, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, China; 3. Institute of Applied Mechanics & Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract: Objective To evaluate the biomechanical properties of fibroblasts for rabbit experimental myopia after Posterior Scleral Reinforcement (PSR) treatment, and discuss the mechanism of PSR in myopia treatment as viewed from biomechanics. **Method** 45 rabbits of three-week-old were randomly monocular treated by eyelid suture to prepare experimental myopia eye. After 60 days, the experimental myopia eyes were divided into two groups randomly. Group A was treated by PSR. Group B was treated by similar operation without placing reinforce strap. After three months and six month, the fibroblasts from each group were isolated and cultured in vitro respectively. The cultured cells were then determined to be fibroblasts by using immunocyte chemistry method.

收稿日期:2010-04-02;修回日期:2010-05-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10872140),山西省基础研究项目(2008012013-8)

作者简介:田海霞(1984-),女,硕士研究生,研究方向:眼科学。

通讯作者:王超英,Tel(0311)87998577,E-mail:wanghc191@sina.com。

Micropipette aspiration technique was used to investigate the viscoelastic properties of the fibroblasts from each group with mechanical model of semi-infinite somatic cells. **Results** Three months after operation, the viscoelastic properties of the scleral fibroblasts in Group A and Group B exhibit no significant difference ($P > 0.05$) three months and six months as well ($P > 0.05$) after operation with the equilibrium modulus, E_{∞} , and apparent viscosity, μ of the scleral fibroblasts in Group A ($E = (361.2 \pm 121.1) \text{ Pa}$, $\mu = (2928.2 \pm 669.4) \text{ Pa} \cdot \text{s}$) compared with that in Group B ($E = (347.6 \pm 82.1) \text{ Pa}$, $\mu = (2820.6 \pm 593.5) \text{ Pa} \cdot \text{s}$). Neither in Group A nor Group B, the E_{∞} and μ at different stages after operation have significant difference ($P > 0.05$). The E_{∞} and μ in transition zone tissues at different stages after operation have no significant difference ($P > 0.05$) either. **Conclusions** The enhancement of PSR is caused by transition zone tissues and the strip itself.

Key words : Myopia; Posterior scleral reinforcement; Cells culture; Scleral fibroblasts; Micropipette aspiration; Elastic modulus; Viscoelastic properties

近视是目前全球发病率最高的屈光不正性疾病,近年来近视的发病率也在不断的上升,且发病年龄趋向低龄化。目前角膜屈光手术如 PRK、LASIK 等,只能减轻部分屈光异常,不能有效阻止后巩膜葡萄肿及视网膜病变的发生和发展。目前对后巩膜加固术的研究多从组织水平,生物力学及组织检测结合进行研究,并未见对加固后组织进行细胞生物-生物力学方面的研究。本实验对家兔建立形觉剥夺性近视再行后巩膜加固术,从细胞水平对后巩膜加固术后进行研究,观察后巩膜加固术的疗效,为该手术在临床上的选择、推广提供理论指导,并进一步了解后巩膜加固术的作用机理,从而为近视的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与分组

3 周龄未脱离母乳喂养的新西兰家兔 45 只,雌雄不限(由河北医科大学实验动物养殖场提供),随机分为两组。每只动物均随机选择,随机选择一侧眼为实验眼,另外一侧眼为自身对照眼(阴性对照组),近视诱导成功后实验眼随机分为两组,部分行后巩膜加固手术(A 组),阳性对照组行近似手术(仅不放置加固条带)(B 组)。实验前后检测双眼屈光状态及眼轴长度,幼兔均于室内标准化喂养。

1.2 主要试剂及仪器

4% 多聚甲醛、DMEM 培养基、二甲基亚砷(美国 Gibco 公司)、兔抗鼠 Vimentin、Desmin、keratin、S-100 免疫组化试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)、带状光检眼镜(苏州)、眼科 A/B 型超声诊断仪(BME-210,中国)、HPIAS-1000 图象分析系统(中国)。

1.3 家兔形觉剥夺性近视模型的建立

将家兔标记编号,双眼结膜囊滴 1% 托吡卡胺滴眼液 4 次,每次间隔 10 min,带状光检影验光,股部肌肉注射盐酸氯胺酮(50 mg/kg)致全身麻醉,用 A 超测量双眼球眼轴长度,测量以手动模式连续测量 10 次,计算平均值,精确到 10 μm 。测量结束后,随机选择家兔一眼为实验眼,另眼为自身对照,在全身麻醉状态下,无菌操作以 5-0 丝线缝合上下眼睑,封闭实验眼,氯霉素眼液、红霉素眼膏点眼以防治感染。将家兔喂养 60 天后,打开眼睑,按前述方法再次验光和测量眼轴长度。

1.4 动物模型设计及制备

将经环氧乙烷消毒后的涤纶补片制成宽 5 mm、长 30 mm 的条带以备用。手术在无菌条件下进行,采用 2.5% 的戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔内注射麻醉,0.5% 丁卡因表面麻醉,常规消毒铺单后,开睑器开睑,做 270° 球结膜角膜缘切口(除外内眦部),充分分离球结膜及筋膜组织与巩膜,作上、下、外直肌牵引线,将外直肌剪断,将所选的加固条带穿过上直、外直、下直肌下方使其位于眼球后极部,两端分别用 8-0 尼龙缝线间断缝合固定于上直肌、下直肌的止点鼻侧缘,球结膜拉回原位,术毕。相似手术组仅不放置加固条带,余操作均相同。分笼喂养,所有兔的术后喂养,室温及管理条件完全一致。喂养期间因感染等意外死亡的家兔均及时补充,保证各组例数为 10 只。

1.5 取材及实验方法

分别于术后 3 个月、6 个月处死动物各 20 只,摘除眼球,实验眼分别取后巩膜加固术区部位的巩膜及过渡区组织,对照眼取与实验眼相对应部位的

巩膜,以原位培养的方法培养成纤维细胞,将A组细胞分为A1组(3月巩膜组)、A2组(3月过渡区组)、A3组(6月巩膜组)、A4组(6月过渡区组),B组分为B1组(3月巩膜组)、B3组(6月巩膜组)。取融合好的部分原代细胞,用免疫细胞化学方法对细胞进行鉴定。当细胞融合达90%时传代以备后用。

1.6 微管吸吮系统

首先给单个细胞施加0~10 Pa的负压,使巩膜细胞发生弹性响应产生微小变形,并与微管管口密封,持续时间20 s,以此作为初始状态。随后,调节水箱高度,通过三通开关施加幅值为50 kPa的阶跃负压,经60 s平衡后,细胞达到稳态,记录细胞不同时间和相应的吸入长度。施加的最大负压值为50~800 Pa。

1.7 统计学分析

成纤维细胞的力学特性均为定量测量,为计量资料,各组间比较均采用组间差异行完全随机单因素方差分析和秩和检验,各组数据采用 $\bar{x} \pm sd$ 表示,数据采用SPSS 13.0统计软件处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 家兔实验性近视的诱导结果

眼脸缝合前双眼屈光度无明显差异,经过60天形觉剥夺诱导后,实验眼与对照眼屈光度比较,诱导出 $(1.80 \pm 1.37) \text{ m}^{-1}$ 的相对近视,眼轴相对延长了 $(0.45 \pm 0.29) \text{ mm}$,差异有统计学意义($P < 0.05$)见表1、2。

表1 形觉剥夺前后兔眼的前后轴长变化 $[(\bar{x} \pm sd) \text{ mm}]$

Tab.1 Length of Ocular anteroposterior axis before and after form deprivation $(\bar{x} \pm sd)$

	实验眼/mm	对照眼/mm
实验前	12.29 ± 0.85	12.13 ± 0.63*
实验后	15.14 ± 0.48	14.69 ± 0.53 [#]

注:与实验眼组比较,* $P > 0.05$;与实验眼组比较,[#] $P < 0.05$

2.2 细胞培养鉴定结果

细胞免疫组织化学法鉴定显示成纤维细胞 Vimentin 染色阳性,胞浆内可见棕黄色阳性反应产物,Desmin 染色阴性,keratin 染色阴性,S-100 染色阴

性,证实所培养的细胞为成纤维细胞(见图1)。

表2 形觉剥夺前后兔眼的屈光度变化 $[(\bar{x} \pm sd)^\circ]$

Tab.2 Diopter of rabbits eyes before and after form deprivation $[(\bar{x} \pm sd)^\circ]$

	实验眼/ $^\circ$	对照眼/ $^\circ$
实验前	7.90 ± 0.68	7.35 ± 1.09*
实验后	5.85 ± 1.40	7.65 ± 1.16 [#]

注:与实验眼组比较,* $P > 0.05$;与实验眼组比较,[#] $P < 0.05$

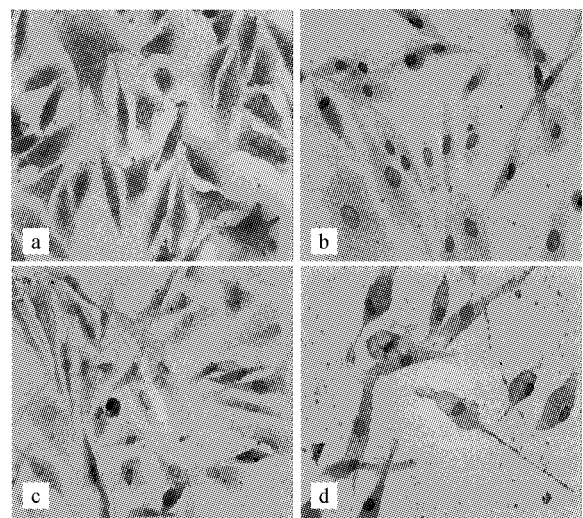


图1 用细胞免疫组织化学法显示的成纤维细胞($\times 400$)

Fig.1 Immunocytochemistry showing the fibroblasts. a: Vimentin(+), b: Desmin(-), c: keratin(-), d: S-100(-). ($\times 400$)

2.3 成纤维细胞力学特性及统计学分析

后巩膜加固术后3个月、6个月,A组中巩膜成纤维细胞平衡弹性模量和表观黏性分别为: $E_\infty = (352.1 \pm 85.3) \text{ Pa}$, $(361.2 \pm 121.1) \text{ Pa}$; $\mu = (2873.3 \pm 615.4) \text{ Pa} \cdot \text{s}$, $(2928.2 \pm 669.4) \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 。B组的巩膜成纤维细胞平衡弹性模量和表观黏性分别为: $E_\infty = (341.8 \pm 91.1) \text{ Pa}$, $(347.6 \pm 82.1) \text{ Pa}$; $\mu = (2818.3 \pm 590) \text{ Pa} \cdot \text{s}$, $(2820.6 \pm 593.5) \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 。经统计学分析,两组巩膜成纤维细胞的在同一时间的平衡弹性模量及表观黏性差异均无统计学意义($P > 0.05$)。后巩膜加固术后3月组、6月组的B组巩膜成纤维细胞,无论是平衡弹性模量还是细胞表观黏性,其差异均无统计学意义($P > 0.05$)。后巩膜加固术后3个月、6个月过渡区的成纤维细胞

的力学特性,无论是平衡弹性模量还是细胞表观黏性,其差异均无统计学意义($P > 0.05$,见表3~6)。

表3 术后不同时期实验组与对照组巩膜成纤维细胞弹性模量比较 [$n=10$, ($\bar{x} \pm sd$) Pa]

Tab.3 Comparison of Young's modulus in scleral fibroblasts of experimental eye with control eye at different stages after surgery [$n=10$, ($\bar{x} \pm sd$) Pa]

	实验眼/Pa	对照眼/Pa
3月	352.1 ± 8 523	341.8 ± 91.1 *
6月	36 122 ± 121.1	347.6 ± 82.1 #

注:与实验眼组比较, * $P > 0.05$;与对照眼组比较, # $P > 0.05$

表4 术后不同时期实验组与对照组巩膜成纤维细胞黏性系数的比较 [$n=10$, ($\bar{x} \pm sd$) Pa · s]

Tab.4 Comparison of viscoelastic properties in scleral fibroblasts of experimental eye with control eye at different stages after surgery [$n=10$, ($\bar{x} \pm sd$) Pa · s]

	实验眼/(Pa · s)	对照眼/(Pa · s)
3月	2 873.3 ± 615.4	2 818.3 ± 590 *
6月	2.928 2 ± 669.4	2 820.6 ± 593.5 #

注:与实验眼组比较, * $P > 0.05$;与对照眼组比较, # $P > 0.05$

表5 术后不同时期实验组加固区与过渡区巩膜成纤维细胞弹性模量的比较 [$n=10$, ($\bar{x} \pm s$) Pa]

Tab.5 Comparison of Young's modulus of fibroblasts between two locus of experimental eye at different stages after surgery [$n=10$, ($\bar{x} \pm sd$) Pa]

	弹性模量/Pa	
	3月	6月
加固区	352.1 ± 85.3	361.2 ± 121.1 *
过渡区	289.2 ± 84.3	276.9 ± 113.9 #

注:与3月组比较, * $P > 0.05$;与6月组比较, # $P > 0.05$

表6 术后不同时期实验组加固区与过渡区巩膜成纤维细胞黏性系数的比较 [$n=10$, ($\bar{x} \pm sd$) Pa · s]

Tab.6 Comparison of viscoelastic properties of fibroblasts between two locus of experimental eye at different stages after surgery [$n=10$, ($\bar{x} \pm sd$) Pa · s]

	黏性系数/Pa · s	
	3月	6月
加固区	2 873.3 ± 615.4	2 928.2 ± 669.4 *
过渡区	1 575.2 ± 459	1 492.2 ± 562.6 #

注:与3月组比较, * $P > 0.05$;与6月组比较, # $P > 0.05$

3 讨论

以往对巩膜生物力学特性的研究,常采用方法是将巩膜制成大小不等的试件,在力学实验机上测量弹性模量、蠕变率、极限应力、极限应变等指标。随着对细胞力学行为更加深入细致的研究,人们不断将其应用到眼科领域的研究中。本实验通过对成纤维细胞力学特性的研究,从细胞-生物力学的角度进一步探讨后巩膜加固术的作用机制。

力学特性(弹性模量、黏弹性)是细胞的一种固有属性。巩膜实质层主要由成熟的胶原纤维、成纤维细胞及细胞外基质组成,其本身的结构决定力学特性。巩膜的部位不同其功能也不同,后部巩膜外层纤维像气球外面的网一样排列,内层则呈扇状散开,以适应眼压的上升,前部巩膜则迥然不同,它作为眼外肌附着的“硬骨”,由紧密的环行纤维构成^[1]。影响成纤维细胞力学特性的因素很多,其中细胞骨架(Cytoskeleton)对细胞力学特性的影响最大。

后巩膜加固术能有效控制病理性近视的发展,阻止玻璃体视网膜病变等并发症的发生。以往研究多建立在组织水平研究后巩膜加固术的作用机制,肖林等^[2]用不同材料对家兔行后巩膜加固术,术后不同时期对大体形态及光、电镜观察结果显示人工心包补片代替生物材料进行后巩膜加固术比较理想。张学锋等^[3]选取最常用的几种加固材料:人巩膜、兔巩膜、人工心包补片、脱细胞猪真皮,进行单轴拉伸、蠕变、极限抗拉强度实验,表明人工心包补片只有极小的蠕变,用其作加固材料长期疗效会更好,这也是本实验选用人工心包补片作为加固材料的原因。王晓君等^[4]对兔眼行后巩膜加固术,发现术后加固条带区巩膜试件胶原含量的变化与弹性模量的变化趋势相近,增加巩膜的胶原含量能提高巩膜的线弹性模量,从而增强巩膜抵抗变形的能力。Shelton和Rada等^[5]研究了在应力刺激下巩膜成纤维细胞与细胞外基质之间的作用关系,实验结果表明,巩膜成纤维细胞的力学特性改变必然会对其形态、结构和功能产生影响。

有研究发现在外部机械应变刺激下可引起巩膜成纤维细胞基因表达发生变化,这些变化基因涵盖了影响细胞受体、蛋白激酶、细胞生产因子、ECM、脂

类代谢、蛋白代谢、糖类代谢、转换生长因子、结合蛋白等功能的所有基因网^[6]。因此,巩膜成纤维细胞生物特性的改变是轴性近视眼轴延长、巩膜发生重塑的关键因素之一。以往的研究表明,高度近视眼巩膜整体的生物力学强度降低^[7],在实验性近视眼巩膜成纤维细胞弹性模量较正常眼增强。巩膜组织整体力学性质下降时,巩膜成纤维细胞本身反应性的出现力学特性代偿性增强,以弥补和代偿巩膜组织整体力学性能的减弱,这是细胞本身对生长环境中力学性质变化做出的主动代偿反应。本研究对后巩膜加固术后不同时期的成纤维细胞行细胞生物力学研究,结果显示同期实验组与阳性对照组巩膜成纤维细胞生物力学特性差异无统计学意义,3月组与6月组巩膜成纤维细胞生物力学特性比较亦无统计学意义,3月组与6月组过渡区成纤维细胞力学特性比较亦无统计学意义,在细胞水平说明后巩膜加固术的不同时期并未引起原位巩膜成纤维细胞力学特性(平衡弹性模量、表观黏性)的增强,后巩膜加固术本身起到后部巩膜增强的作用的主要原因还在于加固条带本身及引起的过渡区的存在。

参考文献:

- [1] Rada JA, Nickla DL, Troilo D. Decreased proteoglycan synthesis associated with form deprivation myopia in mature primate eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(8): 2050-2058.
- [2] 肖林,赵光喜,刘晶,等. 不同材料后巩膜加固术的研究[J]. *眼科研究*, 2000, 18(2): 132-135.
- [3] 张学锋,陈维毅,王超英,等. 几种后巩膜加固材料力学性能比较[J]. *太原理工大学学报*, 2004, 35(5): 530-532.
- [4] 王晓君,李涛,陈维毅,等. 巩膜胶原含量与其生物力学性能的关系研究[J]. *太原理工大学学报*, 2007, 38(4): 371-373.
- [5] Shelton Lilian, Jody Summers Rada. Effects of cyclic mechanical stretch on extracellular matrix synthesis by human scleral fibroblasts [J]. *Experimental Eye Research*, 2006, 10(4): 1-9.
- [6] Cui W, Bryant MR, Sweet PM, *et al*. Changes in gene expression in response to mechanical strain in human scleral fibroblasts [J]. *Experimental Eye Research*, 2004, 78: 275-284.
- [7] 孙朝晖,王超英,靳胜利,等. 实验性近视眼巩膜生物力学特征研究[J]. *眼视光学杂志*, 2006, 8(4): 209-213.