

蛋白激酶 C 活性调节剂对豚鼠近视眼视网膜 Müller 细胞的作用及意义

毛俊峰 刘双珍 秦文娟 李凤云 谭 浅 吴小影 夏朝华

Effect and significance of protein kinase C regulators on retinal Müller cells of myopic eye in guinea pig

Mao Junfeng, Liu Shuangzhen, Qin Wenjuan, Li Fengyun, Tan Qian, Wu Xiaoying, Xia Zhaohua. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China

Abstract Objective To investigate the effect of protein kinase C (PKC) activator, PMA, and PKC inhibitor, GF109203X, on the growth state and PKC protein in the primary cultured retinal Müller cells of myopic eye in guinea pig. **Methods** The form-deprived myopia model was induced in 30 guinea pigs by translucent goggles. Retinal Müller cells from myopia model were isolated and cultured using enzyme-digesting method and identified by glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Vimentin stain. Cultured retinal Müller cells were divided into normal control group, myopia group, myopia plus PMA 10 nmol/L group, myopia plus PMA 100 nmol/L group, myopia plus PMA 1 000 nmol/L group, myopia plus GF109203X 0.1 $\mu\text{mol/L}$ group, myopia plus GF109203X 1 $\mu\text{mol/L}$ group and myopia plus GF109203X 10 $\mu\text{mol/L}$ group. Cell vitality was evaluated by MTT colorimetry, and the apoptotic Müller cells were detected by one-step TUNEL staining. The expression of PKC protein in cultured retinal Müller cells was analyzed by Western blotting. **Results** After 14 days, the occluded eyes became myopic in guinea pigs. Over 95% cultured cells showed positive reaction for GFAP and Vimentin. Compared with normal control group, the expression of PKC protein was significantly increased in myopia group ($P < 0.05$), and that in myopia plus 100 nmol/L PMA and myopia plus 1 000 nmol/L PMA groups was stronger than in 10 nmol/L PMA group ($P < 0.05$). No statistically significant change was found between 100 nmol/L PMA group and 1 000 nmol/L PMA group ($P > 0.05$). The expression of PKC protein in myopic Müller cells was significantly decreased in 1 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$ GF109203X groups, and a statistically significant enhance was seen in 10 $\mu\text{mol/L}$ GF109203X group compared with 1 $\mu\text{mol/L}$ GF109203X group ($P < 0.05$). **Conclusion** PKC protein may be involved in the formation of form-deprived myopia. The level of PKC protein in retinal Müller cells is regulated by PMA and GF109203X to certain degree.

Key words retinal Müller cell; protein kinase C; myopia; PMA; GF109203X

摘要 目的 研究蛋白激酶 C (PKC) 激活剂 PMA 和抑制剂 GF109203X 对豚鼠近视眼视网膜 Müller 细胞生长状态及 PKC 蛋白表达的影响。 **方法** 眼罩遮盖诱导近视模型, 酶消化法培养其视网膜 Müller 细胞, 并鉴定。PMA、GF109203X 分别干预近视眼 Müller 细胞。MTT 测细胞活力, TUNEL 染色检测凋亡细胞, Western blotting 测 PKC 蛋白表达。 **结果** 95% 以上的培养细胞阳性表达胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 和波形蛋白 (Vimentin)。近视组 PKC 蛋白表达较正常组上调 ($P < 0.05$)。PMA、GF109203X 均能引起近视眼 Müller 细胞的抑制率升高和诱导其凋亡 ($P < 0.05$)。PMA 诱导近视眼 Müller 细胞 PKC 蛋白表达进一步上调, 100 nmol/L 组和 1 000 nmol/L 组表达量高于 10 nmol/L 组 ($P < 0.05$)。1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ GF109203X 均能引起近视眼 Müller 细胞 PKC 蛋白表达下调, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的抑制作用大于 1 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$)。 **结论** PKC 蛋白在豚鼠近视眼视网膜 Müller 细胞表达升高, 且其表达受 PMA 和 GF109203X 调控。

关键词 视网膜 Müller 细胞; 蛋白激酶 C; 近视; PMA; GF109203X

分类号 R 774.03 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)01-0005-05

亡、神经传导等过程。Müller 细胞是视网膜最主要的神经胶质细胞,目前已证实 Müller 细胞内存在 PKC 信号传导通路^[1-2]。因此,我们利用已建立的豚鼠形觉剥夺性近视眼模型^[3],原代培养其视网膜 Müller 细胞,分别用 PKC 激活剂 PMA 和抑制剂 GF109203X 进行干预,研究其对豚鼠近视眼视网膜 Müller 细胞生长状态及 PKC 蛋白表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 豚鼠近视眼模型的制作

3 周龄三色豚鼠 30 只(中南大学动物部提供),体重 180 ~ 220 g。0.3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉 22 只豚鼠,用自制半透明眼罩遮盖右眼,缝 3 ~ 4 针把眼罩固定于眼眶周围组织,其余 8 只豚鼠作为正常对照。遮盖 14 d 后,0.5% 托吡卡胺散瞳验光测屈光度, A 型超声(Cinescan A/B, 法国 Quantel Medical 公司)测眼轴长度,测 3 次,取平均值。

1.2 豚鼠视网膜 Müller 细胞的原代培养

豚鼠腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,75% 乙醇浸泡消毒 5 min。摘除眼球,分离出神经视网膜,放入完全培养液,剪碎,0.25% 胰蛋白酶消化 10 min,吸管吹打,制成细胞悬液,置于 37 °C 5% CO₂ 培养。24 h 后首次换液,去除悬浮细胞,以后每 3 ~ 4 d 换液 1 次,待细胞汇合成片、贴壁细胞达 80% 以上时按 1:2 传代。第 2 代 Müller 细胞接种于盖玻片上,用于胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和波形蛋白(Vimentin)免疫组织化学染色(1:100,美国 Santa Cruz 公司)。

1.3 药物干预及实验分组

PMA、GF109203X(德国 Merck 公司)分别加入第 2 代近视眼 Müller 细胞,作用 3 h。PMA 浓度为 10、100、1 000 nmol/L,GF109203X 浓度为 0.1、1.0、10.0 μmol/L。把 Müller 细胞分为 8 个组:正常对照组、近视组、近视 + PMA 10 nmol/L 组、近视 + PMA 100 nmol/L 组、近视 + PMA 1 000 nmol/L 组、近视 + GF109203X 0.1 μmol/L 组、近视 + GF109203X 1 μmol/L 和近视 + GF109203X 10 μmol/L 组。

1.4 MTT 比色法检测 Müller 细胞活力

收集第 2 代 Müller 细胞,加入 96 孔板,调整细胞密度至每孔 4 000 个,每孔体积 200 μL。培养至细胞贴壁,加入不同浓度 PMA 或 GF109203X,作用 3 h,每组设 5 个复孔,同时设置空白孔和对照孔。吸去培养液,加入 0.5% MTT(5 mg/mL)溶液 20 μL,继续培养 4 h。每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,低速振荡 10 min,使结

晶物充分溶解。使用酶标仪(德国 BmgLabtech 公司)于 490 nm 处测光吸收值(OD 值),计算细胞抑制率。

1.5 一步法 TUNEL 染色检测凋亡的 Müller 细胞

一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购于碧云天生物技术研究所,操作步骤严格按说明书进行。4% 多聚甲醛固定细胞爬片。滴加 TUNEL 检测液(含 TdT 酶 2 μL、荧光标记液 48 μL),避光孵育。荧光显微镜下观察,激发光波长 480 nm,发射光波长 540 nm(绿色荧光)。每张片子随机选取 5 个视野,放大倍数为 400,计数凋亡细胞核,算出凋亡率。

1.6 Western blotting 检测 PKC 蛋白表达

取第 2 代 Müller 细胞并裂解,Bradford 法测蛋白质浓度。取蛋白样品 25 μg,进行 10% 不连续 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。电转移蛋白至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封闭。加入 1:500 的兔抗 PKC 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),4 °C 过夜,滴加二抗,发光、显影、定影。Bandscan5.0 图像分析软件对目的条带进行灰度分析,以 GAPDH(北京博奥森生物技术有限公司)作内参,计算 PKC 蛋白相对表达量(PKC 蛋白相对表达量 = PKC 蛋白条带灰度值/GAPDH 条带灰度值)。

1.7 统计学方法

计量资料所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学处理。各组间豚鼠眼屈光度、眼轴长度的比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 Dunnett *t* 检验;视网膜 Müller 细胞抑制率、凋亡率及 PKC 蛋白相对表达量的比较,均采用多因素方差分析,组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 豚鼠近视眼模型

眼罩遮盖 14 d 后,豚鼠遮盖眼眼轴延长、近视形成,其屈光度、眼轴长度分别与自身对照眼、正常对照眼比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)(表 1)。

表 1 豚鼠近视模型眼球屈光度、眼轴长度的变化($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Change of ocular refraction and axial length in guinea pig model($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Refraction (D)	Axial length(mm)
Normal control	8	+0.50 ± 0.15 ^b	8.10 ± 0.05 ^b
Self-control	22	+0.60 ± 0.21 ^b	8.12 ± 0.06 ^b
Deprived eyes	22	-3.25 ± 0.40	8.36 ± 0.10
<i>F</i>		19.682	15.278
<i>P</i>		0.002	0.007

^b*P* < 0.05 vs respective deprived eyes(One-way ANOVA, Dunnett *t* test)

2.2 豚鼠视网膜 Müller 细胞的培养和鉴定

原代培养 24 h 后,部分细胞贴壁,部分呈椭圆形,有的堆积成团。首次换液去除大部分混杂细胞,贴壁的 Müller 细胞分裂旺盛,长出小突起、伸展,胞体饱满。10 d 后 Müller 细胞形态基本稳定,胞体较大、扁平,呈三角形、多角形或梭形等,折光性暗,胞核多为椭圆形,位于胞体中央或略偏位(图 1)。一般 30 ~ 35 d 后 Müller 细胞融合成片,相互交错或平行排列,进行传代。传代细胞多在 15 ~ 20 d 基本融合。95% 以上的培养细胞阳性表达 GFAP 和 Vimentin,胞浆内有大量棕黄色颗粒(图 2,3)。

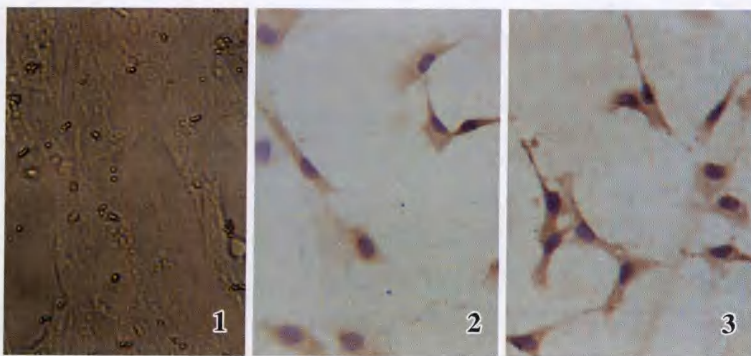


图 1 原代培养的豚鼠近视眼 Müller 细胞($\times 400$) 图 2 豚鼠近视眼 Müller 细胞阳性表达 GFAP($\times 400$) 图 3 豚鼠近视眼 Müller 细胞阳性表达 Vimentin($\times 400$)

Fig. 1 Primary cultured Müller cells in myopic eyes of guinea pigs($\times 400$) Fig. 2 Positive expression for GFAP in cultured Müller cells in myopic eyes($\times 400$) Fig. 3 Positive expression for Vimentin in Müller cells of myopia of guinea pig($\times 400$)

2.3 PMA、GF109203X 对视网膜 Müller 细胞活力和凋亡的影响

MTT 检测结果显示:正常对照组和近视组 Müller 细胞的抑制率为 0;加入 PMA、GF109203X 均引起近视眼 Müller 细胞的抑制率升高($P < 0.05$);随着 PMA、GF109203X 浓度的增高,对 Müller 细胞的抑制率进一步升高,PMA 100 nmol/L 组与 10 nmol/L 组、1 000 nmol/L

组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);GF109203X 1 $\mu\text{mol/L}$ 组与 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。

TUNEL 染色结果显示:活的视网膜 Müller 细胞的胞核呈弥散均匀的绿色荧光(图 4);发生凋亡时 DNA 断裂、核染色质浓缩,胞核内见浓染致密的颗粒状绿色荧光(图 5)。正常对照组和近视组的 Müller 细胞均未检测到凋亡细胞;PMA 和 GF109203X 能诱导近视眼 Müller 细胞发生凋亡,且凋亡率随 PMA、GF109203X 浓度的增高而升高;PMA 100 nmol/L 组与 10 nmol/L 组、1 000 nmol/L 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),GF109203X 1 $\mu\text{mol/L}$ 组与 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较差异亦均有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。

2.4 PMA、GF109203X 对视网膜 Müller 细胞 PKC 蛋白表达的影响

原代培养的豚鼠近视眼、正常对照眼视网膜 Müller 细胞均表达 PKC 蛋白,且在近视组表达上调($P < 0.05$)。10、100、1 000 nmol/L PMA 均能诱导近视眼 Müller 细胞 PKC 蛋白表达升高($P < 0.05$),PKC 蛋白在 100 nmol/L 组和 1 000 nmol/L 组的表达量均高于 10 nmol/L 组($P < 0.05$),但 100 nmol/L 组和 1 000 nmol/L 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ GF109203X 均能引起 PKC 蛋白在近视眼 Müller 细胞的表达降低($P < 0.05$),且 10 $\mu\text{mol/L}$ 组的表达量低于 1 $\mu\text{mol/L}$ 组

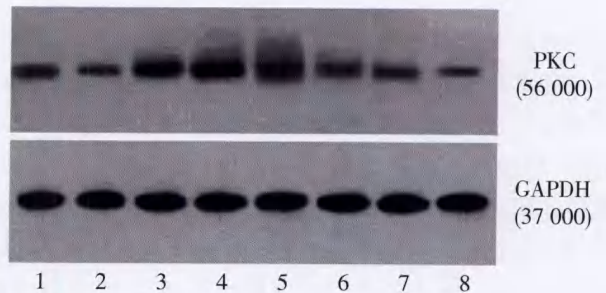


图 6 豚鼠视网膜 Müller 细胞 PKC 蛋白的 Western blotting 电泳图 内参:GAPDH;1:近视组;2:正常对照组;3:近视 + PMA 10 nmol/L 组;4:近视 + PMA 100 nmol/L 组;5:近视 + PMA 1 000 nmol/L 组;6:近视 + GF109203X 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组;7:近视 + GF109203X 1 $\mu\text{mol/L}$ 组;8:近视 + GF109203X 10 $\mu\text{mol/L}$ 组

Fig. 6 Western blotting detection of PKC protein in retinal Müller cells of guinea pig Internal control: GAPDH 1: myopia 2: normal control 3: myopia + PMA 10 nmol/L 4: myopia + PMA 100 nmol/L 5: myopia + PMA 1 000 nmol/L 6: myopia + GF109203X 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 7: myopia + GF109203X 1 $\mu\text{mol/L}$ 8: myopia + GF109203X 10 $\mu\text{mol/L}$

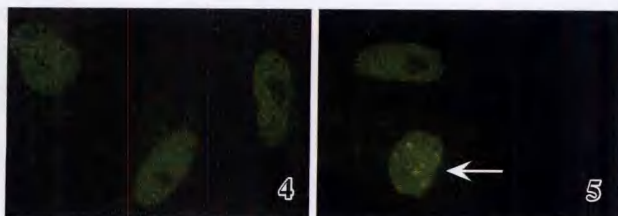


图 4 近视组未发生凋亡的 Müller 细胞($\times 1 000$) 图 5 近视 + PMA 100 nmol/L 组凋亡的 Müller 细胞(箭头)($\times 1 000$)

Fig. 4 No apoptotic Müller cell is seen in myopia group($\times 1 000$) Fig. 5 Apoptotic Müller cells show fluorescence in myopia + PMA 100 nmol/L group (arrow)($\times 1 000$)

($P < 0.05$)。与近视组比较, PKC 蛋白在 GF109203X 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组的表达有下降趋势, 但两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 6, 表 2)。

表 2 豚鼠视网膜 Müller 细胞抑制率、凋亡率及 PKC 蛋白的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Change of inhibiting rate, apoptotic rate and PKC protein in retinal Müller cells of guinea pig ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Inhibiting rate (%)	Apoptotic rate (%)	PKC protein
Normal control	0	0	0.20 \pm 0.02
Myopia	0	0	0.52 \pm 0.05 ^b
Myopia + PMA 10 nmol/L	0.11 \pm 0.06 ^b	0.07 \pm 0.04 ^b	0.67 \pm 0.04 ^{bch}
Myopia + PMA 100 nmol/L	0.24 \pm 0.09	0.17 \pm 0.08	0.93 \pm 0.10 ^{bc}
Myopia + PMA 1000 nmol/L	0.53 \pm 0.15 ^{bn}	0.46 \pm 0.19 ^{bn}	0.91 \pm 0.08 ^{bc}
Myopia + GF109203X 0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.05 \pm 0.04 ^k	0.09 \pm 0.05 ^k	0.47 \pm 0.04 ^{bk}
Myopia + GF109203X 1 $\mu\text{mol/L}$	0.26 \pm 0.08	0.18 \pm 0.09	0.28 \pm 0.03 ^{bc}
Myopia + GF109203X 10 $\mu\text{mol/L}$	0.57 \pm 0.17 ^{kq}	0.62 \pm 0.25 ^{kq}	0.16 \pm 0.04 ^{ekq}
F	13.591	14.635	26.912
P	0.004	0.003	0.000

^b $P < 0.05$ vs respective normal control, ^c $P < 0.05$ vs myopia, ^h $P < 0.05$ vs myopia + PMA 10 nmol/L, ⁿ $P < 0.05$ vs myopia + PMA 100 nmol/L, ^k $P < 0.05$ vs myopia + GF109203X 0.1 $\mu\text{mol/L}$, ^q $P < 0.05$ vs myopia + GF109203X 10 $\mu\text{mol/L}$ (ANOVA, SNK-*q* test)

3 讨论

近视眼的发生是在视网膜调控下巩膜主动重塑的结果, 视网膜的调控与其合成、分泌一些信号因子密切相关, 如多巴胺 (dopamine, DA)^[3]、一氧化氮 (nitric oxide, NO)^[4]、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)^[5]、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF β)^[6]、视黄酸^[7]等, 这些信号因子共同构成视网膜调控网络, 影响近视的发生和发展。

Müller 细胞是视网膜内最主要的神经胶质细胞, 其突起广泛分布于视网膜各类神经元胞体和神经纤维之间, 与神经元相互作用, 在视网膜的功能活动中发挥重要作用, 包括支持和营养神经元、维持细胞外离子稳定、参与谷氨酸盐循环及突触信号传递等^[8]。Müller 细胞能合成、分泌多种与近视眼形成密切相关的神经活性物质及信号因子。Kubrusly 等^[9]报道视网膜 Müller 细胞表达酪氨酸羟化酶, 参与视网膜 DA 代谢。另外, Müller 细胞还能合成视黄酸^[10]、bFGF^[11]、TGF- β ^[12]和 NO^[13]。研究证实, 细胞内 bFGF^[14]、TGF- β ^[15]、酪氨酸羟化酶^[16]和 NO^[17]的合成受 PKC 信号通路的调控。目前已发现视网膜 Müller 细胞内存在 PKC 信号传导通路。可见, Müller 细胞可能通过 PKC 信号调控视网膜近视信号因子表达, 进而参与近视眼

的视网膜调控网络。因此, 研究近视眼视网膜 Müller 细胞是否表达 PKC 蛋白及 PMA、GF109203X 对它的影响, 对阐明 Müller 细胞在近视眼发生中的作用及机制有重要意义。

PMA 是一种最常用的佛波酯, 能够结合并激活活 PKC, 引发细胞内一系列的生物反应。GF109203X 的结构与星孢菌素类似, 能够竞争性抑制 PKC 的 ATP 结合位点, 选择性抑制 PKC 活性。本研究发现, 豚鼠视网膜 Müller 细胞能够表达 PKC 蛋白, 且在近视眼中表达上调。PMA 能诱导 PKC 在近视眼 Müller 细胞的表达量升高, 10 nmol/L 作用最小, 100 nmol/L 和 1000 nmol/L 作用无明显差别。PMA 1000 nmol/L 对 Müller 细胞的毒性最大, 尽管 10 nmol/L 的毒性最小, 但其对 PKC 的激活作用也最小, 因此对豚鼠近视眼视网膜 Müller 细胞来说, 选用 100 nmol/L PMA 用于以后的研究比较合适, 既能诱导 PKC 表达明显上调, 其细胞毒性又控制在一定范围之内。同样, 对于 GF109203X 来说, 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 能引起近视眼 Müller 细胞 PKC 蛋白表达下调, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 对 PKC 蛋白表达无明显影响, 而 10 $\mu\text{mol/L}$ 对 Müller 细胞的毒性大, 故选用 1 $\mu\text{mol/L}$ GF109203X 较合适。

总之, 豚鼠视网膜 Müller 细胞内存在 PKC 信号通路, PKC 蛋白在近视眼 Müller 细胞的表达上调。PMA 能诱导近视眼 Müller 细胞 PKC 蛋白表达升高, GF109203X 则引起近视眼 Müller 细胞 PKC 蛋白表达降低。对豚鼠近视眼视网膜 Müller 细胞来说, 100 nmol/L PMA 和 1 $\mu\text{mol/L}$ GF109203X 是比较合适的作用浓度。本研究为进一步探讨 Müller 细胞在近视眼发生中的作用及机制奠定了实验基础。

参考文献

- Swiatek-De Lange M, Stampfl A, Hauck SM, et al. Membrane-initiated effects of progesterone on calcium dependent signaling and activation of VEGF gene expression in retinal glial cells [J]. *Glia*, 2007, 55 (10): 1061 - 1073
- González MI, López-Colom AM, Ortega A. Sodium-dependent glutamate transport in Müller glial cells: regulation by phorbol esters [J]. *Brain Res*, 1999, 831 (1 - 2): 140 - 145
- 魏欣, 刘双珍, 王洁月, 等. 豚鼠形觉剥夺性近视视网膜早基因 c-fos 与酪氨酸羟化酶关系的研究 [J]. *中华眼底病杂志*, 2007, 23 (5): 358 - 359
- Wu J, Liu Q, Yang X, et al. Time-course of changes to nitric oxide signaling pathways in form-deprivation myopia in guinea pigs [J]. *Brain Res*, 2007, 1186: 155 - 163
- Rohrer B, Tao J, Stell WK. Basic fibroblast growth factor, its high- and low-affinity receptors, and their relationship to form-deprivation myopia in the chick [J]. *Neuroscience*, 1997, 79 (3): 775 - 787
- Seko Y, Shimokawa H, Tokoro T. Expression of bFGF and TGF- β_2 in experimental myopia in chickens [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36 (6): 1183 - 1187
- McFadden SA, Howlett MHC, Mertz JR. Retinoic acid signals the direction of ocular elongation in the guinea pig eye [J]. *Vision Res*,

- 2004, 44: 643 - 653
- 8 苟琳, 张作明, 许汉鹏. 视网膜 Müller 细胞在视网膜病变中的作用和研究现状[J]. 眼科研究, 2003, 21(2): 217 - 220
- 9 Kubrusly RC, da Cunha MC, Reis RA, et al. Expression of functional receptors and transmitter enzymes in cultured Müller cells [J]. Brain Res, 2005, 1038(2): 141 - 149
- 10 Edwards RB, Adler AJ, Dev S, et al. Synthesis of retinoic acid from retinol by cultured rabbit Müller cells [J]. Exp Eye Res, 1992, 54(4): 481 - 490
- 11 Harada T, Harada C, Kohsaka S, et al. Microglia-müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration [J]. J Neurosci, 2002, 22(21): 9228 - 9236
- 12 Eichler W, Yafai Y, Wiedemann P, et al. Angiogenesis-related factors derived from retinal glial (Müller) cells in hypoxia [J]. Neuroreport, 2004, 15(10): 1633 - 1637
- 13 Du Y, Sarthy VP, Kern TS. Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004, 287(4): R735 - 741
- 14 Cheng T, Cao W, Wen R, et al. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Müller cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(3): 581 - 591
- 15 Cacace AM, Ueffing M, Han EK, et al. Overexpression of PKC epsilon in R6 fibroblasts causes increased production of active TGFbeta [J]. J Cell Physiol, 1998, 175(3): 314 - 322
- 16 Zhang D, Kanthasamy A, Yang Y, et al. Protein kinase C delta negatively regulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis by enhancing protein phosphatase-2A activity in dopaminergic neurons [J]. J Neurosci, 2007, 27(20): 5349 - 5362
- 17 Teng JC, Kay H, Chen Q, et al. Mechanisms related to the cardioprotective effects of protein kinase C epsilon (PKC varepsilon) peptide activator or inhibitor in rat ischemia/reperfusion injury [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008, 378(1): 1 - 15

(收稿: 2008-08-13 修回: 2008-10-11)

(本文编辑: 胡纯钢 刘艳)

· 临床经验 ·

非新鲜泪小管断裂早期原创口入路吻合的疗效观察

裘项旭 胡美君 叶响荣

泪小管断裂是常见的眼外伤急症之一, 手术吻合断裂的泪小管是其主要的治疗方法, 但基层眼科专业医师对该技术的应用较少, 而外科或全科医师行内眦部及其附近的眼睑裂伤清创时往往容易忽视泪小管断裂的问题。为研究创口已缝合的外伤患者吻合泪小管的时机, 本文回顾性分析近 3 年来的此类病例, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集我院 2004 年 6 月 ~ 2007 年 6 月非新鲜泪小管断裂经原创口入路显微镜下直接寻找断裂泪小管并成功吻合的患者 13 例。其中男 12 例, 女 1 例; 年龄 3 ~ 78 岁; 下泪小管断裂者 9 例, 上下泪小管均断裂者 4 例。患者来院时均已行清创缝合但未行泪小管吻合, 受伤至吻合泪小管时间为 1 ~ 19 d (多数为拆线后仍有溢泪不适而来就诊)。

1.2 治疗方法 所有患者均于原创口入路钝性分离暴露泪小管远近断端, 并显微镜下直接法找到远断端, 麻醉导管置入牵引下行直径 0.8 mm 的硅胶管环形置管 (两端位于鼻腔) 支撑并行泪小管断端吻合, 术后 6 个月拆除硅胶管 (其中 1 例因眼痒等不适难以耐受于术后 3 个月拔管), 典必舒滴眼液点眼 1 周。

2 结果

全部病例拆除硅胶管后泪道冲洗通畅, 11 例在随访期间 (6 个月 ~ 3 年), 泪道冲洗通畅, 无溢泪。2 例拆除硅胶管 3 d 后出现溢泪, 泪道探通提示吻合口处组织有粘连狭窄, 给予庆大霉素 + 地塞米松 + α -糜蛋白酶冲洗后好转。

3 讨论

缝合后第 3 ~ 5 周伤口局部抗拉力强度快速增加, 然后呈缓慢增加, 3 个月左右达到顶点^[1-2], 为正常皮肤强度的 70% ~ 80%。

所以缝合的创口在 3 周内容易在原创口处分离, 从而更容易寻找泪小管远断端。本组患者均成功找到泪小管远断端并吻合。随着时间的延长, 伤口缝合处钝性分离的难度增大, 给泪小管断端吻合的 II 期手术带来一定困难。对此类患者应尽早重新拆开创口吻合泪小管, 以避免长时间后再做新的切口, 使泪小管远断端寻找困难, 增加手术难度, 影响手术效果。5 周以上的陈旧性创口, 皮肤抗拉能力已较强, 难以从原创口进行钝性分离, 而伤后 3 ~ 5 周的患者我们尚未进行过此类手术。

掌握泪道的解剖位置对于寻找陈旧性外伤的泪小管远断端至关重要。泪小点距泪小管近断端 < 3 mm 应在眼睑内侧创口结膜面附近寻找, 距离 3 ~ 6 mm 时应在泪阜旁的结膜创口附近寻找, 而 > 6 mm 者其远断端应位于泪前峰后、内眦韧带下缘附近的鼻侧端创缘^[3]。延期吻合的泪小管断裂患者其远断端多数因管口收缩狭小或炎性物堵塞而难以见到淡粉色或白色喇叭口状结构, 直接法寻找困难时可以采用注水法、泪囊切开法等, 如单根泪小管远端未能找到还可以采用猪尾巴探针法。

置管期间有少数患者会有眼痒等不适, 如能耐受且无眼红、分泌物增多等, 可不予处理; 症状严重不能耐受者可加用糖皮质激素滴眼液点眼并随访眼压情况, 必要时可于 3 个月后拔除硅胶管。

参考文献

- 1 华积德, 郑成竹, 译著. 劳伦斯普通外科学精要 [M]. 第 3 版. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 108 - 117
- 2 王恩华. 病理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 33 - 37
- 3 戴丽华, 张秀果, 韩方菊, 等. 泪小管断裂吻合置管 39 例临床分析 [J]. 眼科研究, 2005, 23(3): 248

(收稿: 2008-07-20)

(本文编辑: 尹卫靖)