

自然光暴露对 PRK 法单眼远视离焦幼年恒河猴角膜组织的影响

王泳¹, 刘良平², 钟兴武^{2,3}

引用:王泳,刘良平,钟兴武. 自然光暴露对 PRK 法单眼远视离焦幼年恒河猴角膜组织的影响. 国际眼科杂志 2019;19(8): 1281-1287

基金项目:广东省科技计划项目(No.2013B060300035)
作者单位:¹(510150)中国广东省广州市,广州医科大学附属第三医院眼科;²(510060)中国广东省广州市,中山大学中山眼科中心;³(570311)中国海南省海口市,中山大学中山眼科中心海南眼科医院
作者简介:王泳,毕业于中山大学,医学博士,主治医师,研究方向:近视眼防治、白内障、屈光手术。
通讯作者:钟兴武,毕业于中山大学,医学博士,主任医师,教授,中山大学中山眼科中心海南眼科医院副院长,研究方向:近视眼防治、角膜病、屈光手术.zhongxwu@mail.sysu.edu.cn
收稿日期:2019-01-11 修回日期:2019-07-17

摘要

目的:探讨自然光暴露对单眼远视离焦幼年恒河猴正常和准分子激光角膜切削术(PRK)损伤后角膜组织潜在的光损伤作用。

方法:选取 12 只 2 月龄恒河猴,行右眼 PRK,矫正度数为 -4.0D,制作单眼远视离焦近视动物模型。幼猴体质量和性别均衡配对后分为两组:人工照明组(AL组, $n=6$)和自然光组(NL组, $n=6$)。两组幼猴饲养于同一人工照明条件室内饲养环境,NL组幼猴每天 9:00~11:00 和 15:00~17:00 于室外随单笼接受自然光照射。PRK 术后裂隙灯检查比较两组 PRK 眼角膜愈合及 haze 形成情况;PRK 术后 50d,每组各取 4 只幼猴双眼泪液,采用蛋白质芯片法检测泪液 11 种细胞因子含量。PRK 术后 180d 取角膜组织,分别行病理组织学检查组织结构变化;免疫组织化学法检测 TGF- β 1 和 α -SMA 表达;TUNEL 法检测细胞凋亡以及采用羟胺法和硫代巴比妥酸法分别测定角膜上皮细胞 SOD 和 MDA 含量。

结果:PRK 术后 NL 组 PRK 眼出现一过性 haze,术后 40d 两组 haze 分级评估有差异($P=0.015$)。PRK 术后 50d,两组 PRK 眼泪液 EGF 和 TGF- β 1 含量均有差异($P=0.045$ 、 0.038),两组间对侧眼均无差异($P>0.05$);且 AL 组、NL 组组内泪液 TGF- β 1 水平有差异($P=0.003$ 、 0.036)。术后 180d,两组双眼角膜组织形态学一致;角膜组织内各层偶见细胞凋亡染色,且无明显 TGF- β 1 和 α -SMA 表达;两组 PRK 眼和对侧眼角膜上皮细胞 SOD 活力和 MDA 含量均无差异($P>0.05$)。

结论:自然光照射量可加剧幼猴 PRK 术后角膜组织修复反应,但远期未对角膜组织造成不可逆病理组织学改变,对正常的幼猴角膜组织无明显光损伤作用。

关键词:恒河猴;自然光;近视;光损伤;细胞凋亡;准分子激光角膜切削术

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.8.04

Effect of sunlight exposure on cornea in infant rhesus monkeys with monocular hyperopic defocus induced by PRK

Yong Wang¹, Liang-Ping Liu², Xing-Wu Zhong^{2,3}

Foundation item: Science and Technology Planning Project of Guangdong Province of China (No.2013B060300035)

¹Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China; ²Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China; ³Hainan Eye Hospital, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-Sen University, Haikou 570311, Hainan Province, China

Correspondence to: Xing - Wu Zhong. Hainan Eye Hospital, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat - Sen University, Haikou 570311, Hainan Province, China. zhongxwu@mail.sysu.edu.cn
Received:2019-01-11 Accepted:2019-07-17

Abstract

• **AIM:** To observe whether exposure to natural light causes damage on corneal tissue in infant rhesus monkeys with monocular hyperopic defocus induced by PRK.

• **METHODS:** Twelve infant rhesus monkeys (aged 2mo) were treated monocularly with PRK (-4.0D) and divided into two groups: AL group ($n=6$) and NL group ($n=6$). The monkeys in AL were reared under artificial lighting (indoor). The monkeys in NL were exposed to natural lighting(outdoor) for 4h per day (9:00-11:00 and 15:00-17:00), and to indoor lighting for the rest of the light phase. Corneal haziness after PRK was assessed biomicroscopically using the Fantes scale. At 50d post-PRK, tear fluids of both eyes from 8 monkeys in the two groups (4 animals each group) were collected and analyzed for 11 kinds of cytokines using protein microarray analysis. At 180d post-PRK. The corneas were obtained and evaluated by histopathological examination, immunohistochemistry with antibody to TGF- β 1 and α -SMA, and TUNEL. The vitality of SOD and the level of MDA in corneas were detected with WST-1 and lipid peroxidation MDA assay kits, respectively.

• **RESULTS:** The monkeys in AL group exhibited a lesser degree of haze than those in NL group at 40d following PRK ($P=0.015$). At 50d post-PRK, EGF and TGF- β 1 levels in tears were different in PRK-treated eyes between the two groups ($P=0.045$, 0.038), and TGF- β 1 were significantly different between both eyes in the same

group (AL: $P=0.003$; NL: $P=0.036$). At 180d post-PRK, there were no differences in histological changes, the expression of TGF- β 1 and α -SMA, and apoptosis cell staining of the corneal between the two groups. The vatility of SOD and the levels of MDA in corneal epithelium were not different between the two groups ($P>0.05$).

• CONCLUSION: Exposure to natural light in our study could not induce light damage to the normal cornea of the infant rhesus monkeys, but it could aggravate the corneal tissue repair reaction transiently post-PRK.

• KEYWORDS: rhesus monkey; sunlight; myopia; light damage; apoptosis; PRK

Citation: Wang Y, Liu LP, Zhong XW. Effect of sunlight exposure on cornea in infant rhesus monkeys with monocular hyperopic defocus induced by PRK. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(8):1281-1287

0 引言

近视发病率近年全球性攀升,其发病呈低龄化和严重化趋势^[1]。尽管近视的发病机制至今未能明确,但大部分学者认为它是屈光发育期异常视觉经历导致的屈光发育异常。流行病学研究证实增加户外活动时间是防控青少年近视的独立保护因素^[2-5],每周增加1h日光下户外活动,近视发生风险下降2%。比较户外与室内环境的视觉因素,自然光暴露是两者区别之一。我们前期实验结果表明每天自然光暴露3h可延缓幼年恒河猴远视性光学离焦近视的发展,而且幼年期自然光暴露经历也有利于维持双眼的正视化^[6]。因此自然光可作为保护因素在近视防控加以利用。然而,流行病学调查指出长期自然光暴露与翼状胬肉、慢性结膜炎、复发性单纯疱疹病毒性角膜炎等多种眼表疾病的发病率相关^[7-8]。大量实验研究也证实自然光中的多种光学成分及自然光的高辐射强度特性可破坏眼部组织正常生理状态,造成光损伤^[9-10]。为此,明确自然光对眼组织存在光损害,尽可能在防控近视和避免眼组织光损伤之间取得平衡,是制定合理近视防治措施的重要内容。本实验比较不同光照条件下幼年恒河猴泪液多种细胞因子表达量,角膜组织形态学改变、细胞凋亡状况及细胞氧化应激代谢产物含量,了解自然光是否在影响屈光系统发育的同时对眼表组织存在光损伤危险,为制定安全有效的近视防控手段提供更全面科学的实验数据和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 2月龄健康幼年恒河猴12只购于广东蓝岛生物技术有限公司,雌性2只,雄性10只。依体质量和性别配对后,随机分为两组:人工照明组(artificial light group, AL组, $n=6$ 只)和自然光组(natural light group, NL组, $n=6$ 只)。本实验获中山大学中山眼科中心动物实验伦理委员会审核批准(批准号:2014-069)。

1.1.2 主要试剂 QAH-CUST蛋白芯片试剂盒(RayBiotech),蛋白定量测试盒(南京建成生物工程研究所)、SOD测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)、MDA测试试剂盒(南京建成生物工程研究所),In Situ Cell Death TMR Tunel试剂盒(Roche),DAPI染料(Sigma),

GTVisionTM III通用型免疫组化试剂(DAKO),TGF- β 抗体(ab53169, Abcam), α -SMA抗体(ab18147, Abcam)。

1.2 方法

1.2.1 实验设计 12只幼猴均采用本课题组准分子激光角膜切削术(photorefractive keratectomy, PRK)制作单眼远视离焦动物模型^[11-12],统一选择右眼为手术眼(PRK眼),矫正度数为-4.0D,切削直径为5.0mm,左眼为对照眼。所有手术操作均由同一经验丰富准分子激光医师实施。单眼PRK术后10d开始动物分组处理,12h:12h光照周期,照明时间为8:00~20:00,光源为荧光日光灯(YK28RR16,28W,6500K)。AL组幼猴始终室内饲养,NL组幼猴除雨天外,每天随笼放置室外接受自然光照射4h(9:00~11:00和15:00~17:00),照度计每天分别于9:00、10:00、11:00、15:00、16:00和17:00测量幼猴双眼连线平面光照强度,范围1320~24380Lx,其中60%以上监测时间点光照度高于10000Lx。其余时间与AL组饲养于同一动物房,实验时长共180d。

1.2.2 幼猴 haze 分级比较 于PRK术后3mo内每10d1次,术后3~6mo内20~30d1次裂隙灯显微镜检查所有实验幼猴术眼,按1990年Fantes分级标准^[13]评估并记录角膜haze情况,比较不同时间点两组分级组成。

1.2.3 泪液多因子蛋白质芯片检测 每组随机选4只幼猴,于PRK术后50d戊巴比妥钠静脉全身麻醉下用毛细管虹吸收集双眼泪液行多因子蛋白芯片检测,每眼收集总量不少于10 μ L,标记离心后-80 $^{\circ}$ C冰箱冷冻保存备用。按Ray Biotech公司QAH-CUST蛋白芯片试剂盒操作检测泪液多种因子含量,包括:神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、白介素-17(interleukin-17, IL-17)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-23(interleukin-23, IL-23)、淋巴管内皮透明质酸受体-1(lymphatic vessel endothelial growth factor, LYVE-1)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor-beta1, TGF- β 1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。

1.2.4 角膜病理组织及免疫组化检查 PRK术后180d,戊巴比妥钠静脉注射过量麻醉处死两组幼猴,取1/2双眼角膜组织、肾脏及眼外肌组织。4%多聚甲醛固定液固定,常规石蜡包埋切片,HE染色,光学显微镜拍照对比组织结构。

1.2.5 角膜免疫组织学检查 组织切片常规脱蜡,抗原修复,3%过氧化氢避光孵育。50 μ L一抗稀释液(Anti-TGF- β 1抗体1:200; Anti- α -SMA抗体1:80)于组织上,室温孵育60min, PBS漂洗。50 μ L A液(GTVisionTM III抗鼠兔通用型免疫组化检测试剂盒内标记有辣根过氧化物酶和抗兔及抗小鼠免疫球蛋白的多聚体分子)于组织上,室温孵育30min, PBS漂洗。滴加显色剂DAB工作液50 μ L,室温孵育,光镜下控制显色,蒸馏水冲洗终止显色。苏木精复染,常规脱水透明,中性树脂封片。

1.2.6 幼猴角膜 TUNEL 细胞凋亡检测 取组织石蜡切片,常规脱蜡、复水, PBS漂洗。组织切片浸入20 μ g/mL蛋白酶K Tris-HCl工作液中重组DNase I溶于50mmol/L pH7.5的Tris-HCl,25 $^{\circ}$ C处理10min,制作阳性对照样品。按说明书配制TUNEL反应混合液,每个组织样本滴加

表1 两组术后不同时间 PRK 眼 haze 分级比较

组别	20d		30d		40d		50d		60d	
	≤0.5 级	≥1 级	≤0.5 级	≥1 级	≤0.5 级	≥1 级	≤0.5 级	≥1 级	≤0.5 级	≥1 级
AL 组	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0
NL 组	6	0	3	3	1	5	2	4	5	1
<i>P</i>	1		0.182		0.015		0.061		1	

表2 术后 50d 两组双眼泪液因子浓度情况

($n=4, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

指标	PRK 眼(OD)		<i>t</i>	<i>P</i>	对侧眼(OS)		<i>t</i>	<i>P</i>
	AL 组	NL 组			AL 组	NL 组		
NGF	0.144±0.171	0.158±0.21	-0.184	0.861	0.169±0.19	3.40±5.66	-0.988	0.379
EGF	119.0±42.09	55.93±26.71	2.533	0.045	84.62±23.15	40.50±19.91	2.502	0.067
IFN	59.45±57.31	103.65±76.08	-1.002	0.355	24.26±11.22	47.55±22.62	-1.598	0.185
IL-1	8.48±6.68	6.6±5.68	0.420	0.689	5.21±13.6	10.44±2.74	-2.967	0.061
IL-17	17.46±27.32	7.67±9.29	0.678	0.523	0.81±1.14	2.25±2.03	-1.012	0.369
IL-6	96.01±8.11	93.09±73.49	0.079	0.940	415.32±612.81	167.28±102.38	0.691	0.527
IL-23	79.40±58.15	114.51±26.01	-1.259	0.255	55.29±48.31	35.05±31.72	0.607	0.577
LYVE-1	200.71±123.06	176.08±133.5	0.271	0.795	211.13±67.34	168.83±44.84	0.909	0.415
TGF-β1	1106.47±146.21	1596.51±341.39	-2.642	0.038	641.09±164.72	716.39±196.63	-0.508	0.638
TNF-α	52.07±55.26	46.02±34.59	0.185	0.859	19.12±18.03	18.81±3.46	0.030	0.978
VEGF	2264.88±903.85	1937.20±1155.8	0.447	0.671	3625.65±584.55	2308.59±787.96	2.323	0.081

50μL TUNEL 反应混合液, 37℃ 避光湿盒中反应 60min, PBS 漂洗。5mg/mL DAPI 核酸染液, 滴 50μL 于样本, 避光作用 15min, PBS 漂洗。50μL 抗荧光淬灭封片剂, 盖玻片封片, 荧光显微镜检测信号。

1.2.7 幼猴角膜上皮组织丙二醛和超氧化物歧化酶测定

室温平衡保存于-80℃ 冰箱的角膜组织样本, 小圆刀片刮除角膜上皮组织, 电子天平称重, 1:9 与 4℃ 生理盐水混合冰上机械匀浆, 2500r/min 离心 10min, 去上清液混合生理盐水稀释成 0.5% 角膜上皮组织匀浆。按蛋白定量测定说明书指引考马斯亮蓝法, 波长 595nm, 测 OD 值, 按公式计算待测定蛋白浓度。按丙二醛(MDA)测试盒(TBA法)说明书配制试剂, 按操作步骤, 波长 532nm 测 OD 值, 按公式计算组织 MDA 含量。按超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(WST-1 法)说明书配制试剂, 波长 450nm 测 OD 值, 按公式计算 SOD 活力。

统计学分析: 采用统计学软件 SPSS19.0 进行统计学分析。两组不同时间点 haze 分级比较采用 Fisher 确切概率法。两组泪液细胞因子、MDA 和 SOD 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均符合正态分布则采用独立样本 *t* 检验, 同组双眼数据比较采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 幼猴 PRK 眼 haze 分级比较 两组幼猴 PRK 术后 4d 内术眼角膜上皮均完全愈合。实验观察期间, AL 组幼猴术眼全程无明显肉眼可见 haze 形成, 即 haze 分级为 0.5 级及以下, 50d 仅 2 只幼猴 haze 为 0.5 级, 其余角膜均透明; 而 NL 组幼猴术后 30~70d 术眼发生不同程度 haze, 0.5 级~2 级不等, 术后 40~50d 达高峰, 此后逐渐减轻, 70d 后基本消退。两组 haze 分级评估于 40d 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 其余时间点无显著性差异, 见表 1。

2.2 泪液多因子蛋白质芯片检测结果 采用多因子蛋白质芯片检测 PRK 术后 50d 两组幼猴双眼泪液 11 种细胞因子表达量, 各细胞因子在幼猴泪液中有不同程度的表

达, 见表 2。分析结果发现 AL 组与 NL 两组间 PRK 眼泪液 EGF 和 TGF-β1 含量差异均具有统计学意义($P < 0.05$), 进一步比较组内双眼泪液 EGF 含量无显著性差异(AL 组: $t = 1.819, P = 0.166$; NL 组: $t = 1.428, P = 0.249$), 见图 1A。TGF-β1 的组内双眼泪液表达量则差异有统计学意义(AL 组: $t = 8.757, P = 0.003$; NL 组: $t = 3.620, P = 0.036$), 见图 1B。其余各细胞因子表达量组间和组内比较均无统计学差异, 见表 2。

2.3 角膜免疫组织化学检查 光照实验结束时(PRK 术后 180d), 两组双眼角膜全层组织 TGF-β1 和 α-SMA 免疫组织化学染色均为阴性, 随机取两组幼猴肾脏组织为 TGF-β1 阳性对照, 取两组幼猴前臂肌肉组织为 α-SMA 阳性对照, 排除角膜组织假阴性结果可能。结果表明术后 180d, 两组 PRK 眼全层角膜组织无明显 TGF-β1(图 2)和 α-SMA 表达(图 3), 与对侧眼一致。

2.4 角膜病理组织学检查 实验结束时 AL 组与 NL 组角膜病理组织学检查结果基本一致, NL 组 PRK 眼除前弹力层缺失外, 其余各层组织与两组对侧眼结构一致。角膜上皮细胞完整, 形态规则, 排列整齐, 细胞间连接紧密, 细胞层数约 5~6 层; 角膜基质层纤维排列规整, 其中散在角膜细胞, 未见炎症细胞浸润及典型成纤维细胞; 角膜内皮细胞单层排列整齐, 细胞间连接紧密(图 4)。

2.5 角膜组织 TUNEL 检测结果 光照实验结束时, 两组双眼角膜全层组织偶见散在阳性染色细胞, 两组间无明显差异, 组间 PRK 眼与对侧眼阳性染色亦无明显差异(图 5)。经 DNase I 处理同组角膜组织切片为阳性对照, 结果示角膜上皮细胞层、基质层及内皮细胞层可见明显阳性染色(图 5D), 排除实验结果假阴性可能。

2.6 幼猴角膜上皮组织 MDA 和 SOD 活力测定 两组 PRK 眼和对侧眼角膜上皮细胞 SOD 活力和 MDA 含量差异均无统计学意义(PRK 眼: MDA: $t = 0.504, P = 0.632$; SOD: $t = -0.429, P = 0.683$; 对侧眼: MDA: $t = -1.161, P = 0.297$; SOD: $t = -0.388, P = 0.711$), 见表 3。

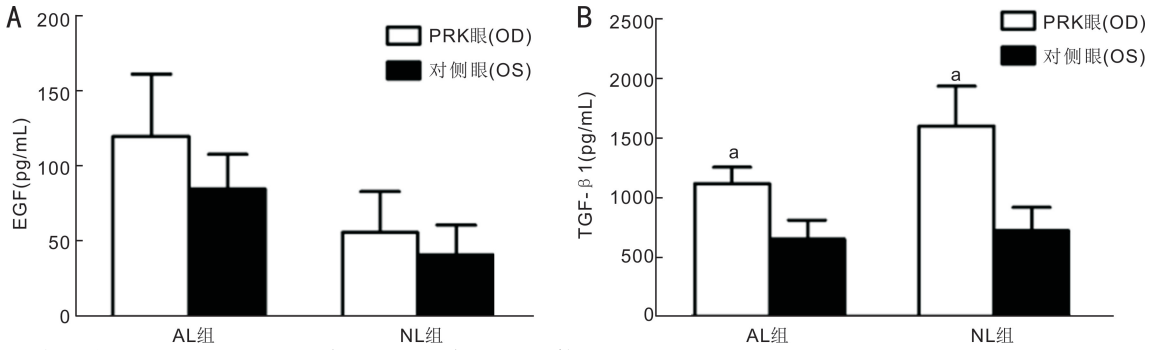


图1 两组组内泪液 EGF 和 TGF-β1 比较 A: 组内 EGF 比较: AL 组: $t = 1.819, P = 0.166$; NL 组: $t = 1.428, P = 0.249$; B: 组内 TGF-β1 比较: AL 组: $t = 8.757, P = 0.003$; NL 组: $t = 3.620, P = 0.036$; ^a $P < 0.05$ PRK 眼 vs 对侧眼。

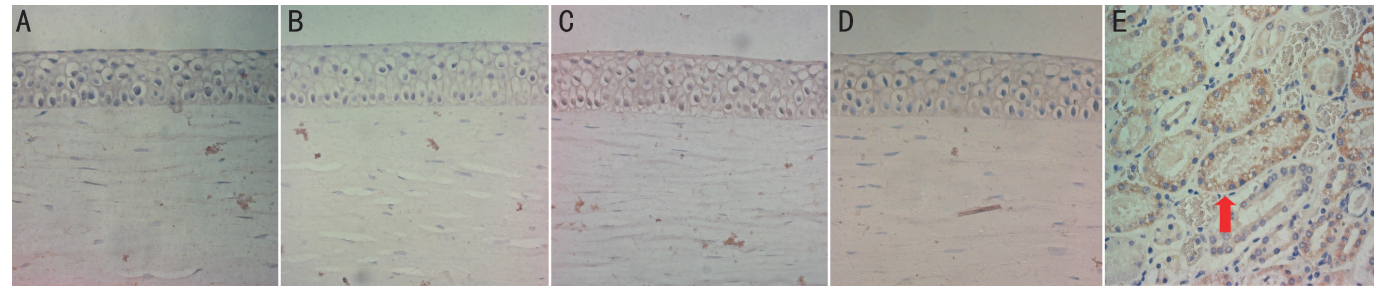


图2 幼猴角膜组织及肾脏组织 TGF-β1 免疫组织化学染色 (×400) A: AL 组 PRK 眼角膜组织; B: AL 组对侧眼角膜组织; C: NL 组 PRK 眼角膜组织; D: NL 组对侧眼角膜组织; E: 阳性对照幼猴肾脏组织, 箭头所示为细胞浆内棕色阳性染色。

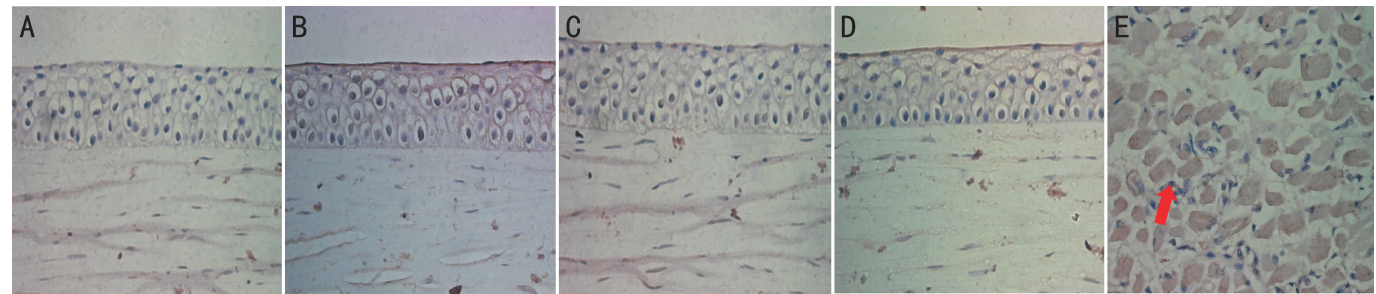


图3 幼猴角膜组织和肌肉组织 α-SMA 免疫组织化学染色 (×400) A: AL 组 PRK 眼角膜组织; B: AL 组对照眼角膜组织; C: NL 组 PRK 眼角膜组织; D: NL 组对侧眼角膜组织; E: 阳性对照幼猴肌肉组织, 箭头所示为细胞浆内棕色阳性染色。

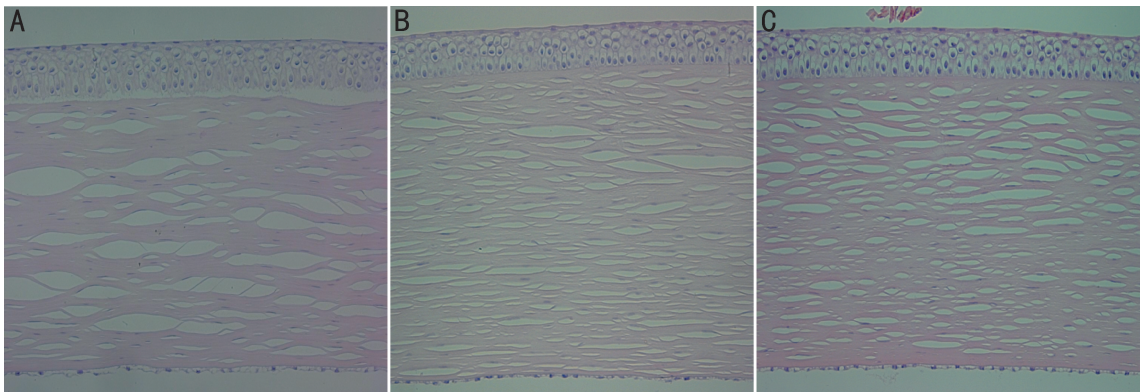


图4 两组双眼角膜病理组织学检查, 均为角膜全层切片 (×200) A: NL 组 PRK 眼; B: NL 组对侧眼; C: AL 组对侧眼。

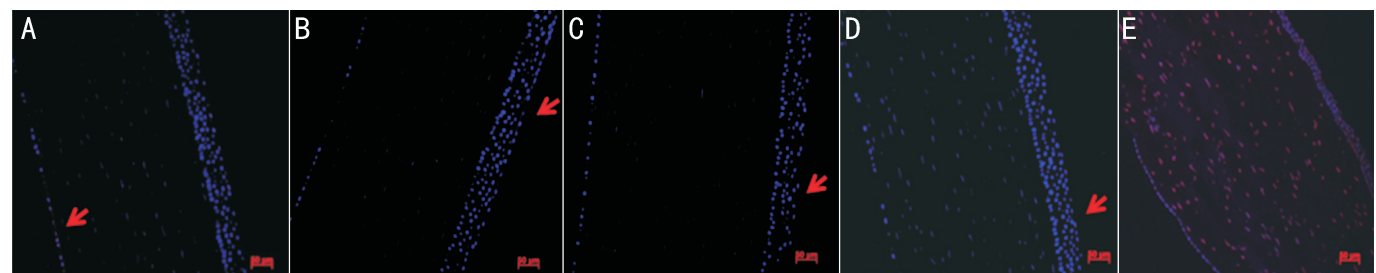


图5 两组双眼角膜组织 TUNEL 染色 (×200) A: AL 组 PRK 眼; B: AL 组对侧眼; C: NL 组 PRK 眼; D: NL 组对侧眼; E: 阳性对照。箭头所示为散在阳性染色。

表3 两组角膜上皮组织MDA含量及SOD活力比较

(n=6, $\bar{x} \pm s$)

指标	PRK眼		t	P	对侧眼		t	P
	AL组	NL组			AL组	NL组		
MDA含量(nmol/mgprot)	3.45±0.52	3.24±0.66	0.504	0.632	2.97±0.61	3.38±0.38	-1.161	0.297
SOD活力(U/mgprot)	40.48±6.82	42.60±7.17	-0.429	0.683	40.16±5.22	41.38±3.46	-0.388	0.711

3 讨论

大量研究已证实增加户外活动时间是预防近视发生发展的保护因素,屈光发育期自然光暴露时间越长,近视风险越低^[4, 14-15]。另一方面,过度自然光暴露可引起眼部组织的光损伤,其损伤程度取决于光源波长、光照强度、作用时间和组织生物学特性、代谢状态。以紫外光为例,自然光中90%的紫外光被角膜上皮组织选择性吸收,其光损伤的靶组织为角膜。鼠、兔和恒河猴的动物实验已证实一定累积量的紫外线辐射可造成以细胞凋亡为主,伴炎症细胞浸润的组织病理学改变。进一步分子生物学发病机制研究表明,光化学损伤是角膜光损伤的主要原因,即足够能量的光子破坏组织细胞的DNA、RNA或蛋白质结构,最终造成靶细胞凋亡^[10, 16-17]。其中由光化学氧化应激产生的大量自由基、与凋亡相关的多种细胞因子失衡及信号通路改变被认为参与或介导了眼组织光损伤的细胞凋亡^[18]。因此,在利用自然光防控近视的研究中,其安全性应引起足够重视。

本研究自然光照射时间为每天4h,共170d,观察自然光暴露对屈光发育期幼猴正常角膜组织的影响。实验早期光照50d,AL组与NL组对照眼的泪液11种因子含量分析均无统计学差异,提示自然光照射未引起正常眼表多种炎症、修复、免疫相关细胞因子改变。光照170d实验结果显示两组角膜组织学结构未见明显差异,TUNEL法检测组织凋亡细胞数量两组无明显差异,提示本研究的自然光辐射量并未引起角膜特征性的光损伤组织病理学改变及凋亡细胞数量增多。检测角膜上皮组织在氧化应激过程中重要的脂质过氧化产物MDA,以间接反映细胞氧化损伤的程度。两组MDA含量差异无统计学意义,提示自然光并未增加角膜上皮细胞氧化损伤的程度。分析原因可能与以下两个方面有关:(1)组织代谢状态:正常眼部组织含有多种抗氧化物,如:抗坏血酸、维生素E、谷胱甘肽、过氧化氢酶、SOD、谷胱甘肽还原酶和过氧化酶等,一定程度上抵御光化学氧化应激损伤。当抗氧化物抗氧化能力不足以清除氧化应激自由基产物时,组织即发生光损伤改变,而组织抗氧化能力随年龄增加而降低^[19]。本研究实验对象为2~8月龄的幼年恒河猴,尽管未进行不同年龄组恒河猴角膜上皮组织抗氧化酶活性的比较,但根据其他文献报道结果推测幼猴角膜上皮代谢功能旺盛,抗氧化物储备充足,能及时清除自然光照射产生的细胞内脂质氧化产物,可能是本研究最终角膜组织维持正常形态结构的原因之一。(2)辐射能量:日常生活中户外活动所接受的自然光辐射能量与所处纬度、海拔高度、季节、日时段、周围环境、地面情况及是否有日照防护措施有关^[20-21]。Zigman等研究结果显示全年UVB最强辐射量出现在夏季中午11:00~1:00之间,北纬40度7日中午每小时UVB地面辐射量可高达1.1J/cm²^[20]。但因为辐射

量可被各种大气成分和周围环境植被和各种建筑物吸收和反射,而且在非直视太阳的情况下眼球组织有眼睑保护,实际上仅17%~30%地面紫外辐射量可影响角膜组织,因此实际组织辐射量远较地面辐射理论值低。本实验观察历时170d,选择上午9:00~11:00和下午15:00~17:00两个时间段进行自然光照射,避开光照辐射最强时间段;而且猴笼及周围绿色植被、建筑物也可一定程度降低辐射量,动态测量光照度发现仅个别时间点光照度高于20000Lx,远低于夏日中午阳光直射60000~70000Lx的光照强度。研究表明,相同辐射量的照射光,照射时间越长,光损伤的可能性越小。Slaney等指出每天8h紫外线辐射总量为0.3mJ/cm²是角膜的安全辐射量,不会引起角膜组织光损伤性病理改变^[22]。而Cejka等^[23]使用波长312nm紫外线光源,每天照射2.5min,共4d可达紫外线辐射总量为0.25mJ/cm²,能引起兔眼角膜组织明显水肿增厚,该辐射量相当于在紫外线辐射最强的夏日午间,人眼直视太阳2.56h角膜所接受的紫外线辐射总量。可见,角膜组织光损伤实验研究中使用的照射光辐射能量远高于人们日常生活进行的户外活动中所接受的自然光辐射能量。本研究干预措施与现实情况更为接近,较低的辐射能量可能是角膜未出现光损伤改变的另一原因。

除正常角膜组织外,本研究通过幼猴PRK模型,观察长期自然光暴露对角膜创伤愈合过程的影响。研究表明,PRK手术损伤后的角膜上皮细胞合成并分泌与炎症反应、细胞增殖、细胞转化和细胞外基质沉积等一系列修复相关的细胞因子,其中包括EGF、IL-1、IL-6、TGF、TNF- α 、IFN- γ 、NGF等。复杂的细胞因子网络及其相互之间的级联反应介导角膜上皮-基质相互作用,诱发并加重角膜基质细胞凋亡,激活伤口附近的角膜基质细胞增殖、移行,进而使其转化为肌成纤维细胞,合成细胞外基质以完成修复反应^[24-25]。细胞凋亡水平越高,后续角膜组织修复反应越剧烈,临床表现为程度更为严重的角膜haze和屈光回退。因此动态评估术后角膜haze程度并检测组织中的各种细胞因子含量和细胞凋亡数量可从不同角度反映角膜组织损伤修复的状态。本研究AL组幼猴全过程无肉眼可见haze形成,组织修复反应轻,50d仅2只幼猴发生0.5级haze,与Zhong等^[11-12]研究结果相符。而NL组在术后30~50d出现一过性haze形成,尽管未见3~4级严重haze发生,但术后40d的haze分级两组间仍有显著性差异,至术后70dNL组haze才基本消退,两组haze程度和消退时间的差别提示本研究的自然光照射量可能加重了PRK术后修复反应并延长修复反应时间,其结论与Nagy等^[26]研究相近。

进一步检测术后50d泪液11种细胞因子含量,其中仅TGF- β 1表达水平两组组内PRK眼均较对侧眼高,而且两组PRK眼间也有显著性差异,NL组高于AL组。

TGF- β 1 是 PRK 术后角膜基质层修复最重要的细胞因子,在 PRK 术后的角膜上皮细胞、基质细胞、成纤维细胞中的表达增加,可诱导角膜细胞向肌成纤维细胞转型,促使胶原合成,加速伤口愈合。组织修复程度越严重,TGF- β 1 水平越高,与 haze 分级正相关^[27]。本研究 NL 组 40~50d 为 haze 形成高峰,TGF- β 1 泪液表达水平两组间和组内双眼间均有显著性差异,提示 PRK 术后 50d,角膜组织处于组织修复反应期,自然光照射通过增加 TGF- β 1 表达水平加剧组织修复反应程度。如前所述,角膜组织吸收大部分自然光紫外线成分(波长 295~400nm),其中中波长紫外线 UVB 对角膜组织最具危害,高强度的 UVB 可引起角膜上皮急性损伤,如电光性眼炎;长波长紫外线 UVA 组织损伤阈值较高但可长期积累,有慢性光损伤的风险。研究表明,细胞凋亡是光损伤的主要病理改变,鉴于细胞凋亡与 PRK 术后组织修复反应的密切关系,我们推测自然光照射增加了角膜组织细胞凋亡的程度,引起修复相关细胞因子表达增加,从而加重了组织修复反应程度。此外,两组 PRK 眼泪液 EGF 表达量差异有统计学意义,但两组组内双眼间表达量无显著性差异。EGF 是维持角膜上皮细胞稳定性的主要细胞因子,临床上观察 PRK 术后早期 EGF 表达量升高,术后 1mo 泪液 EGF 分泌量与术前无明显差异^[28],原因可能是 PRK 术后组织损伤程度轻,不足以引起长期泪液 EGF 含量的明显改变,与本研究两组组内双眼结果相符;而 AL 组 PRK 眼泪液 EGF 表达量高于 NL 组,有研究提示 EGF 与 TGF- β 在组织的表达量往往有相反的变化趋势^[29],这一现象是否与细胞因子间的相互作用有关,还有待进一步研究验证。而其他与炎症和免疫相关的多种因子两组间未见明显差异,则提示 PRK 术后 50d 自然光照射并未加重角膜组织的炎症反应。

在实验结束时(PRK 术后 180d),两组 PRK 眼角膜组织结构病理学特征基本一致,组织内未见明显纤维修复细胞因子 TGF- β 1 及成纤维细胞标志物 α -SMA 阳性表达,两组 PRK 眼凋亡细胞数量与对照眼均无明显差异,均表明 PRK 术后 180d 角膜组织修复已完成,且自然光照射量并未引起不可逆的角膜组织结构改变。从另一角度说明本研究中的自然光紫外线辐射量虽能加重 PRK 术后角膜损伤修复活动期的反应程度,但对修复反应也已完成角膜组织无明显光损伤作用。

综上所述,本研究所采用的自然光照射在延缓幼年恒河猴近视发生的同时,对正常的幼猴角膜组织无明显光损伤作用。该自然光辐射量可加剧幼年恒河猴 PRK 术后修复早期的角膜组织修复反应,但远期未对角膜组织造成不可逆损伤。

参考文献

- 1 Dolgin E. The myopia boom. *Nature* 2015;519(7543):276-278
- 2 Lingham G, Milne E, Cross D, et al. Investigating the long-term impact of a childhood sun-exposure intervention, with a focus on eye health: protocol for the Kidskin-Young Adult Myopia Study. *BMJ Open* 2018;8(1):e020868
- 3 Wu PC, Chen CT, Lin KK, et al. Myopia Prevention and Outdoor Light Intensity in a School-Based Cluster Randomized Trial. *Ophthalmology* 2018;125(8):1239-1250
- 4 Zhou Z, Chen T, Wang M, et al. Pilot study of a novel classroom

- designed to prevent myopia by increasing children's exposure to outdoor light. *PLoS One* 2017;12(7):e0181772
- 5 Mak CY, Yam JC, Chen LJ, et al. Epidemiology of myopia and prevention of myopia progression in children in East Asia: a review. *Hong Kong Med J* 2018;24(6):602-609
- 6 Wang Y, Ding H, Stell WK, et al. Exposure to sunlight reduces the risk of myopia in rhesus monkeys. *PLoS One* 2015;10(6):e0127863
- 7 Grupcheva CN, Grupchev DI, Radeva MN, et al. UV damage of the anterior ocular surface - microstructural evidence by *in vivo* confocal microscopy. *Cont Lens Anterior Eye* 2018;41(6):482-488
- 8 Aletras AJ, Trilivas I, Christopoulou ME, et al. UVB-mediated down-regulation of proteasome in cultured human primary pterygium fibroblasts. *BMC Ophthalmol* 2018;18(1):328
- 9 Delic NC, Lyons JG, Di Girolamo N, et al. Damaging Effects of Ultraviolet Radiation on the Cornea. *Photochem Photobiol* 2017;93(4):920-929
- 10 Kronschlager M, Talebizadeh N, Yu Z, et al. Apoptosis in Rat Cornea After *In Vivo* Exposure to Ultraviolet Radiation at 300 nm. *Cornea* 2015;34(8):945-949
- 11 Zhong X, Ge J, Nie H, et al. Effects of photorefractive keratectomy-induced defocus on emmetropization of infant rhesus monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(10):3806-3811
- 12 Zhong X, Ge J, Nie H, et al. Compensation for experimentally induced hyperopic anisometropia in adolescent monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(10):3373-3379
- 13 de Medeiros FW, Mohan RR, Suto C, et al. Haze development after photorefractive keratectomy: mechanical vs ethanol epithelial removal in rabbits. *J Refract Surg* 2008;24(9):923-927
- 14 Rucker F, Britton S, Spatcher M, et al. Blue Light Protects Against Temporal Frequency Sensitive Refractive Changes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(10):6121-6131
- 15 翟露露, 伍晓艳, 许韶君, 等. 接触阳光与儿童近视关联的研究进展. *中华流行病学杂志* 2016;37(11):1555-1560
- 16 Zinlou C, Rochette PJ. Ultraviolet A-induced oxidation in cornea: Characterization of the early oxidation-related events. *Free Radic Biol Med* 2017;108:118-128
- 17 Sacca SC, Cutolo CA, Ferrari D, et al. The Eye, Oxidative Damage and Polyunsaturated Fatty Acids. *Nutrients* 2018;10(6)
- 18 Chen SJ, Lee CJ, Lin TB, et al. Inhibition of Ultraviolet B-Induced Expression of the Proinflammatory Cytokines TNF- α and VEGF in the Cornea by Fucoxanthin Treatment in a Rat Model. *Mar Drugs* 2016;14(1):13
- 19 Hayes S, Cafaro TA, Boguslawska PJ, et al. The effect of vitamin C deficiency and chronic ultraviolet-B exposure on corneal ultrastructure: a preliminary investigation. *Mol Vis* 2011;17:3107-3115
- 20 Godar DE. UV doses worldwide. *Photochem Photobiol* 2005;81(4):736-749
- 21 Godar DE, Urbach F, Gasparro FP, et al. UV doses of young adults. *Photochem Photobiol* 2003;77(4):453-457
- 22 Beani JC, Jeanmougin M. Narrow-band UVB therapy in psoriasis vulgaris: good practice guideline and recommendations of the French Society of Photodermatology. *Ann Dermatol Venereol* 2010;137(1):21-31
- 23 Cejka C, Rosina J, Sirc J, et al. The reversibility of UV-B induced alterations in optical properties of the rabbit cornea depends on dose of UV irradiation. *Photochem Photobiol* 2013;89(2):474-482
- 24 Marino GK, Santhiago MR, Torricelli AA, et al. Corneal Molecular and Cellular Biology for the Refractive Surgeon: The Critical Role of the

Epithelial Basement Membrane. *J Refract Surg* 2016;32(2):118-125
 25 Torricelli AA, Santhanam A, Wu J, et al. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Exp Eye Res* 2016;142:110-118
 26 Nagy ZZ, Hiscott P, Seitz B, et al. Ultraviolet-B enhances corneal stromal response to 193-nm excimer laser treatment. *Ophthalmology* 1997;104(3):375-380
 27 Tomas-Juan J, Murueta-Goyena Larranaga A, Hanneken L. Corneal Regeneration After Photorefractive Keratectomy: A Review. *J Optom*

2015;8(3):149-169

28 Roszkowska AM, De Grazia L, Visalli M, et al. Contact lens wearing and chronic cigarette smoking positively correlate with TGF-beta1 and VEGF tear levels and impaired corneal wound healing after photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res* 2013;38(3):335-341

29 Chung E, Graves-Deal R, Franklin JL, et al. Differential effects of amphiregulin and TGF-alpha on the morphology of MDCK cells. *Exp Cell Res* 2005;309(1):149-160

2018 眼科期刊学术影响力指数 (CI) 排名及分区

本刊讯 由中国科学文献计量评价研究中心和清华大学图书馆联合研制、《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社出版的 2018《中国学术期刊影响因子年报》于 2018 年 10 月 25 日在北京会议中心隆重发布。《年报》发布了反映学术期刊影响力的综合评价指标——学术期刊影响力指数(Academic Journal Clout Index, 简称 CI)。CI 是反映一组期刊中各刊影响力大小的综合指标。《年报》分区选择“影响力指数(CI)”这一综合指标为依据,对每个学科期刊按影响力指数(CI)降序排列,依次按期刊数量平均划分为 4 个区,即 Q1、Q2、Q3、Q4。Q1 区为本学科 CI 指数排名前 25%的期刊。该指标可以更客观地反映期刊的学术影响力水平在本学科期刊群中的相对位置。

2018 眼科期刊学术影响力指数 (CI) 排名及分区

排名	刊名	影响指数(CI)	分区
1	中华眼科杂志	834.134	Q1
2	眼科新进展	690.578	Q1
3	中华眼底病杂志	628.964	Q1
4	国际眼科杂志中文版	569.517	Q1
5	中华实验眼科杂志	523.491	Q2
6	临床眼科杂志	350.761	Q2
7	中国眼耳鼻喉杂志	324.388	Q2
8	中国中医眼科杂志	275.903	Q3
9	中华眼视光学和视觉科学杂志	233.998	Q3
10	中华眼科医学杂志(电子版)	228.396	Q3
11	眼科	196.298	Q3
12	中华眼外伤职业眼病杂志	195.573	Q3
13	中国斜视与小儿眼科杂志	169.619	Q4
14	眼科学报	150.435	Q4
15	国际眼科纵览	110.913	Q4
16	实用防盲技术	41.805	Q4

摘编自 2018 版《中国学术期刊影响因子年报》