

引文格式:钱光霞,谭少健,梁皓,陈迎迎.去整合素 Echistatin 抑制糖尿病兔远期后发性白内障[J].

眼科新进展,2014,34(6):506-509. doi:10.13389/j.cnki.rao.2014.0139

【实验研究】

去整合素 Echistatin 抑制糖尿病兔远期后发性白内障[△]

钱光霞 谭少健 梁皓 陈迎迎

作者简介:钱光霞,女,1986年8月出生,贵州遵义人,在读硕士研究生。联系电话:18078138964; E-mail: youthurb@163.com

About QIAN Guang-Xia: Female, born in August, 1986. Postgraduate student. Tel: 18078138964; E-mail: youthurb@163.com

收稿日期:2014-01-20

修回日期:2014-03-10

本文编辑:付中静

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81160120)

作者单位:530021 广西壮族自治区南宁市,广西医科大学第一附属医院眼科

通讯作者:谭少健, E-mail: shaojian-tan@163.com

Received date: Jan 20, 2014

Accepted date: Mar 10, 2014

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81160120)

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Responsible author: TAN Shao-Jian, E-mail: shaojian-tan@163.com

with $10.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ can not only obviously inhibit the development of long-term PCO in diabetic rabbits, but has no obvious toxic effects on intraocular adjacent tissues, so $10.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ecs can be used in further study.

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34(6):506-509]

【关键词】 去整合素;后发性白内障;增殖细胞核抗原;凋亡;糖尿病兔

【摘要】 目的 观察并探讨不同浓度去整合素(Echistatin, Ecs)对糖尿病兔远期后发性白内障(posterior capsular opacification, PCO)发生过程中晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LEC)增殖的抑制作用,以及其在眼内的安全性。方法 建立糖尿病兔模型,随机分为对照组(A组,术毕前房注入蒸馏水0.2 mL);实验组:B组、C组、D组(术毕前房分别注入 $5.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ecs),术后裂隙灯下观察角膜、前房及PCO情况。术后6周取材,常规石蜡切片,HE染色。用免疫组织化学法检测PCO发生过程中LEC增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达, TUNEL法检测角膜内皮细胞、视网膜神经节细胞层及内核层细胞的凋亡情况。结果 HE染色结果显示,术后6周各组角膜内皮细胞排列整齐、未见水肿,视网膜内界膜与各层组织结构完整,未见药物引起明显的组织损伤反应。各组间PCO分级差异有统计学意义($P=0.011$)。免疫组织化学法检测各组后囊膜PCNA表达结果显示, A组、B组、C组、D组的平均光密度值分别为 0.499 ± 0.043 、 0.484 ± 0.055 、 0.422 ± 0.012 、 0.340 ± 0.031 , B组后囊膜上PCNA表达与A组差异无统计学意义($P>0.05$),余组间两两比较差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)。TUNEL法检测各组角膜内皮细胞、视网膜神经节细胞层及内核层细胞凋亡发现,各组间细胞凋亡比较未见明显差异(均为 $P>0.05$)。结论 $10.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ecs对糖尿病兔远期PCO具有明显抑制作用,且对眼内相邻及重要组织无明显毒性作用,因此可选用此浓度进行后续研究。

[眼科新进展, 2014, 34(6):506-509]

Different concentrations of disintegrin Echistatin in inhibition of long-term posterior capsular opacification in diabetic rabbit

QIAN Guang-Xia, TAN Shao-Jian, LIANG Hao, CHEN Ying-Ying

【Key words】 disintegrin; posterior capsular opacification; proliferating cell nuclear antigen; apoptosis; diabetic rabbits

【Abstract】 **Objective** To observe the inhibitive effects of different concentrations of disintegrin Echistatin (Ecs) on lens epithelial cell (LEC) proliferation during long-term posterior capsular opacification (PCO) development, and discuss the safe concentration in the eyes of rabbits. **Methods** Diabetic rabbit models were established and randomly divided into control group (group A, surgery anterior chamber were injected 0.2 mL of distilled water) and experimental groups (group B, C and D, surgery anterior chamber were injected 0.2 mL Ecs of $5.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $7.5 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $10.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively). After injection, cornea, anterior chamber and PCO were observed under slit lamp. At postoperative 6 weeks, HE staining was performed, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in LEC during PCO development was observed by immunohistochemistry, and TUNEL assay was used to detect the apoptosis of corneal endothelial cells, retinal inner nuclear layer cells and ganglion cells. **Results** HE staining showed that the corneal endothelial cells arranged regularly with no edema, the structure of retinal internal limiting membrane and each layer of tissue were unchanged, no significant drug-induced damage tissue was appeared in each group at postoperative 6 weeks. There was statistical difference in PCO grading among groups ($P=0.011$). Immunohistochemistry staining showed that the average optical density of PCNA expression in posterior capsule of group A, B, C and D were 0.499 ± 0.043 , 0.484 ± 0.055 , 0.422 ± 0.012 and 0.340 ± 0.031 , respectively, there were statistical differences between each two groups except for group A and group B (all $P<0.05$). TUNEL method show that there was no statistical difference in the apoptosis of corneal endothelial cells, retinal inner nuclear layer cells and ganglion cells between each two groups (all $P>0.05$). **Conclusion** Ecs

后发性白内障 (posterior capsular opacification, PCO) 是白内障术后最常见的并发症,也是导致术后视力再次下降的主要原因。糖尿病患者 PCO 的发生率明显高于正常血糖患者,且随着时间的推移而增加^[1]。已有研究证明去整合素 (Echistatin, Ecs) 可明显抑制体外晶状体上皮细胞 (lens epithelial cell, LEC) 的黏附、迁移和增殖^[2]。因此,本实验旨在观察不同浓度 Ecs 在糖尿病兔眼晶状体摘出术后对 PCO LEC 增殖的抑制作用及适宜浓度,为 Ecs 治疗 PCO 提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新西兰大白兔 16 只 (购自广西医科大学实验动物中心),雌雄不限,体质量 2.4 ~ 2.8 kg,眼部检查无异常。

1.1.2 仪器与试剂 Ecs (美国 Sigma 公司,以高压灭菌蒸馏水新鲜配制成实验所需浓度);四氧嘧啶 (美国 Sigma 公司);长效胰岛素注射液 (甘精胰岛素注射液,德国);小鼠抗兔增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体 (武汉博士德);SABC (即用型羊抗小鼠 IgG) 试剂盒及 DAB 显色试剂盒 (武汉博士德);TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (德国 Roche 公司);血糖分析仪、血糖试纸条 (美国强生公司);手术显微镜、眼科显微手术器械、裂隙灯显微镜 (苏州医疗器械厂);病理图像分析系统 (德国莱卡公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及分组 建立糖尿病兔动物模型^[3],将新西兰大白兔用四氧嘧啶按 90 mg · kg⁻¹ 建立糖尿病兔模型,当血糖持续 2 周高于 12 mmol · L⁻¹ 者为建模成功。对于血糖浓度高于 16 mmol · L⁻¹ 者,根据血糖值给予皮下注射长效胰岛素,使其血糖控制在 12 ~ 16 mmol · L⁻¹。16 只 16 眼 (右眼) 糖尿病兔按随机数字表法分为对照组 (A 组) 和 3 组实验组 (B 组、C 组、D 组),每组 4 只 (4 眼)。

1.2.2 药物处理 16 只建模成功的糖尿病兔,每只兔右眼由同一术者行透明晶状体囊外摘出术。A 组术前前房注入蒸馏水 0.2 mL, B 组、C 组、D 组分别注入 5.0 × 10⁻³ μg · L⁻¹、7.5 × 10⁻³ μg · L⁻¹、10.0 × 10⁻³ μg · L⁻¹ Ecs 溶液。术后用庆大霉素地塞米松眼液和阿托品眼液滴术眼 7 ~ 10 d,每天 4 次。夜间涂四环素可的松眼膏,直至角膜水肿、前房渗出消失。

1.2.3 临床观察 术后 1 d、3 d、7 d、10 d、6 周分别用裂隙灯显微镜检查角膜、前房和 PCO 发生情况。对 PCO 发生情况按 Odrieh PCO 分级^[4]: 0 级: 透明; 1 级: 轻度混浊,能看清眼底或混浊面积小于 1/2 后囊膜面积; 2 级: 中度混浊,能模糊看见眼底或混浊面

积大于 1/2 后囊膜面积; 3 级: 完全混浊,不能看见眼底。

1.2.4 组织病理学检查 术后 6 周^[5] 用空气栓塞法处死各组兔,摘取术眼用 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛固定 6 ~ 7 d,经梯度乙醇脱水,二甲苯清洗,石蜡包埋,切片。HE 染色: 切片常规用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗,苏木素染色 5 min,自来水冲洗,盐酸酒精分化 30 s,自来水浸泡 15 min,置伊红液 2 min,常规脱水,透明,封片。免疫组织化学 SABC 法: 二甲苯脱蜡,梯度酒精至水,体积分数 30% H₂O₂ 室温封闭 10 min; 抗原修复,在 0.01 mol · L⁻¹ 枸橼酸盐缓冲液 (pH = 6.0) 中修复 10 min; 滴加体积分数 5% BSA 封闭液封闭 30 min, PCNA 一抗 4 °C 过夜; 山羊抗小鼠 IgG 50 μL, 37 °C 孵育 30 min; SABC 复合物 37 °C 孵育 20 min。每步骤间隔均用 0.01 mol · L⁻¹ PBS (pH = 7.2 ~ 7.6) 冲洗。DAB 显色,苏木素复染,盐酸酒精分化,烘干,封片。结果判定: PCNA 阳性表达为细胞核呈棕黄色。计算阳性细胞平均光密度值 (average optical density, AOD) = 总 OD 值/总面积,普通光学显微镜下每张切片随机选取 6 个高倍视野,求均数和标准差。

1.2.5 TUNEL 法检测角膜内皮细胞、视网膜细胞凋亡 术后 6 周糖尿病兔术眼取材,常规二甲苯脱蜡; 梯度酒精至水,体积分数 3% H₂O₂ 室温封闭 10 min; 抗原修复,在 0.01 mol · L⁻¹ 枸橼酸盐缓冲液 (pH = 6.0) 中修复 10 min; TUNEL 反应液 (TdT 反应液 + 标记液) 50 μL 湿盒 37 °C 孵育 60 min; 转化剂-POD 混合液 50 μL 湿盒 37 °C 孵育 30 min; DAB 显色,苏木素复染,盐酸酒精分化,烘干,封片。普通光学显微镜下随机选取 6 个高倍视野 (×400), 凋亡细胞呈棕黄色,计算角膜内皮凋亡细胞、视网膜神经节及内核层凋亡细胞的 AOD 值, AOD = 总 OD 值/总面积。

1.2.6 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 软件进行处理, Levene 法检测方差齐, 各组间比较采用单因素方差分析, 各组间两两比较采用 LSD 检验; 等级资料用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后观察情况 A 组、B 组、C 组及 D 组术后均出现不同程度的角膜水肿及前房渗出, 4 组角膜水肿均于术后 3 ~ 5 d 基本恢复正常; A 组与 B 组术后前房渗出较少, 于术后 3 ~ 5 d 基本消失, C 组、D 组前房渗出于术后 6 ~ 7 d 恢复正常。

2.2 晶状体 PCO 情况 各组糖尿病兔眼晶状体囊外摘出术后 6 周, 可见随着药物浓度的增加, PCO 程度减轻, 各组间 PCO 分级差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.134, P = 0.011$, 见表 1), 故可认为晶状体 PCO 级别与前房注射 Ecs 浓度有关。

表 1 术后 6 周时各组 PCO 分级情况
Table 1 PCO grading in each group at postoperative 6 weeks

Group	0	1	2	3
A	0	0	2	2
B	0	2	2	0
C	0	4	0	0
D	2	2	0	0

2.3 HE 染色情况 术后 6 周从形态学上观察可见各组角膜内皮细胞均排列整齐、未见水肿,视网膜内

界膜及各层组织结构完整(图 1),未见药物引起明显组织损伤反应。
2.4 免疫组织化学法检测后囊膜 PCNA 表达 术后 6 周免疫组织化学染色结果显示(图 2),A 组后囊膜可见大量 PCNA 阳性表达,B 组也可见较多 PCNA 阳性表达,C 组及 D 组可见少量 PCNA 阳性表达,尤其是 D 组较少。术后 6 周,各组间差异有统计学意义($F=5.638, P=0.012$);B 组与 A 组 PCNA 阳性表达差异无统计学意义($P>0.05$),余组间两两比较差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$,见表 2)。

Figure 1 Pathologic graph at postoperative 6 weeks(HE, $\times 400$;1:Cornea;2:Retina). A:Control group;B:Group D 术后 6 周免眼病理图片(HE $\times 400$;1:角膜;2:视网膜)。A:对照组;D:D 组

Figure 2 Expression of PCNA in LEC at posterior capsule in each group(SP, $\times 400$),LEC nucleus was positive stained with brown-yellow. A-D: Group A to group D 各组后囊膜上 LEC 中 PCNA 的表达(SP, $\times 400$),LEC 细胞核阳性反应呈棕黄色。A、B、C、D 分别为 A 组、B 组、C 组、D 组

表 2 术后各组后囊膜 LEC PCNA 的表达结果
Table 2 PCNA expression in LEC at posterior capsule in each group

Group	AOD	P
A	0.499 \pm 0.043	-
B	0.484 \pm 0.055	0.581 *
C	0.422 \pm 0.012	0.016 #
D	0.340 \pm 0.031	0.000 #

Note:Compared with group A, * $P>0.05$, # $P<0.05$

2.5 角膜内皮细胞及视网膜细胞的凋亡情况
TUNEL 法原位检测凋亡阳性细胞核呈棕褐色,非凋亡细胞核呈蓝色。各组间角膜内皮细胞和视网膜的神经节细胞层及内核层细胞凋亡情况比较差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$,见表 3-表 4)。

3 讨论

有研究表明,糖尿病患者行白内障手术治疗后 PCO 的发生率为 10.0% ~ 57.7%,且随时间的推移而逐渐增加^[6]。本课题前期研究也证明:正常血糖兔眼术后 2 周为 PCO 形成最早期,3 个月为 PCO 形成的最显著期^[7]。糖尿病兔发生 PCO 的最早期为术后 10 d,最显著期为术后 6 周^[5],PCO 发生及发展

表 3 各组视网膜神经节细胞层和内核层细胞的凋亡情况
Table 3 Average optical density of retinal ganglion cells and inner nuclear layer cells apoptosis in each group

Group	AOD	P
A	0.241 \pm 0.018	-
B	0.251 \pm 0.013	0.543 *
C	0.255 \pm 0.032	0.366 *
D	0.269 \pm 0.021	0.090 *

Note:Comparison among all groups, $F=1.180, P=0.358$;Compared with group A, * $P>0.05$

表 4 各组角膜内皮细胞的凋亡情况
Table 4 Average optical density of corneal endothelial cells apoptosis in each group

Group	AOD	P
A	0.296 \pm 0.040	-
B	0.304 \pm 0.035	0.722
C	0.332 \pm 0.024	0.137
D	0.342 \pm 0.025	0.067

Note:Comparison among all groups, $F=1.851, P=0.192$

最早及最显著时间均早于正常兔,说明高血糖可能是加重 PCO 形成的一个重要因素。
在 PCO 的发生及发展过程中,整合素起着重要

作用。PCO 主要是由于术后残留的 LEC 迁移、增殖并纤维化,导致晶状体 PCO 发生^[8]。整合素广泛存在于各种细胞表面,包括 LEC 表面,也是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分的主要受体^[9]。Ecs 属于 Disintegrin 家族的一员,具有其家族相似的分子机制和作用特性^[10]。体内外实验均表明^[11-12],使用与 Ecs 有相似结构的 Salmosin 和 Kistrin 干预后,与对照组相比,可明显抑制 LEC 的黏附、迁移和增殖,从而抑制 PCO 的发展,并且对角膜、虹膜及视网膜均无明显副作用。范鹏举等^[13]研究发现 Ecs 可抑制增生性瘢痕成纤维细胞增殖,促进其凋亡,抑制胶原分泌,减少 ECM 沉积。周星等^[2]研究证明浓度为 $(5 \sim 20) \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ecs 对体外人 LEC 细胞株 SRA01/04 的生长具有抑制作用,呈明显的剂量依赖性及时间依赖性,但浓度为 $20 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞完全失去正常形态,出现崩解坏死。同时本课题组前期研究了 $(5.0 \sim 15.0) \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ecs 对糖尿病兔早期 (10 d) PCO 的抑制作用,结果证明 $15.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ecs 对角膜内皮细胞及视网膜细胞具有明显的促凋亡作用,因此本实验研究了浓度为 $(5.0 \sim 10.0) \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ecs 对糖尿病兔 PCO 发生高峰期 (6 周) 的抑制作用。

通过检测在不同浓度 Ecs 的干预下,糖尿病兔行晶状体囊外摘出术后后囊膜 LEC 中 PCNA 的表达,作为判断 Ecs 是否能抑制后囊膜 LEC 增殖的依据,从而选择 Ecs 在糖尿病兔 PCO 模型中的有效浓度。PCNA 是一种仅在增殖细胞中合成或表达的核内多肽,在细胞周期 G 期的晚期开始增加, S 期达到高峰,因此 PCNA 是细胞周期 S 期的特异性标记,故检测 PCNA 可以很好地评价细胞的增殖状态,可作为检测 LEC 增殖的敏感指标^[14]。本研究结果显示: C 组、D 组均可明显抑制后囊膜 LEC 中 PCNA 表达,但后者抑制作用较强,说明 Ecs 对糖尿病兔后囊膜上 LEC 增殖具有明显抑制作用,而 B 组后囊膜 LEC 中 PCNA 表达与 A 组无明显差异。同时在裂隙灯下观察 PCO 分级同样证明 D 组 Ecs 对糖尿病兔 PCO 的形成抑制作用较明显。其发生机制可能为 Ecs 与 LEC 表面整合素受体结合而抑制了整合素与 ECM 结合,细胞增殖受到抑制,减少了 LEC 与后囊膜的黏附作用,使 LEC 增殖及移行能力进一步下降,凋亡增加,因而抑制了 PCO 的形成。由此说明, $10.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ecs 在糖尿病兔 PCO 模型中使用是有效的,但还需进一步探讨其安全性。

采用 HE 染色法观察各组角膜及视网膜的变化

发现, B 组、C 组、D 组与 A 组角膜和视网膜组织结构均无明显差异,未见组织结构有明显损伤。同时通过 TUNEL 法检测角膜内皮细胞及视网膜神经节细胞层及内核层细胞的凋亡时发现, B 组、C 组、D 组对眼内相邻组织 (角膜) 及重要光感受结构 (视网膜) 均未造成损害,且细胞未发生明显凋亡,说明 $10.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ecs 在眼内使用是安全的。

总之,本研究证明 $10.0 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ecs 在 PCO 的形成中对 LEC 的增殖具有抑制作用,且对眼内相邻及重要组织无明显毒性作用,因此可以选用此浓度在眼内进行后续实验研究,但其在临床应用的可能性尚需进一步探讨。

参考文献

- 1 Hayashi K, Hayashi H, Nakao F, Hayashi F. Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with diabetes mellitus [J]. *Am J Ophthalmol*, 2002, 134 (1): 10-16.
- 2 周星, 谭少健, 梁皓, 李霞. 去整合素 Echistatin 对人晶状体上皮细胞增生、黏附、移行的影响 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31 (4): 329-333.
- 3 韦琦, 陈金卯, 黄敏丽, 李霞, 何剑峰, 谭少健. 糖尿病兔晶状体后囊膜混浊模型的建立 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2011, 29 (2): 130-134.
- 4 Odrich MG, Hall SJ, Worgul BV, Trokel SL, Rini FJ. Posterior capsule opacification: experimental analyses [J]. *Ophthalmic Res*, 1985, 17 (2): 75-84.
- 5 丁文君, 韦琦, 梁皓, 陈金卯, 李霞, 谭少健. 糖尿病兔后发性白内障发生过程中晶状体上皮细胞增殖的变化 [J]. *眼科新进展*, 2012, 32 (1): 5-7.
- 6 Ebihara Y, Kato S, Oshika T, Yoshizaki M, Sugita G. Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with diabetes mellitus [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2006, 32 (7): 1184-1187.
- 7 陈启雷. 兔后囊膜混浊模型的建立及其分子机制研究 [D]. 广西医科大学博士研究生学位论文, 2009.
- 8 Nishi O, Nishi K, Fujiwara T, Shirasawa E, Ohmoto Y. Effects of the cytokines on the proliferation of and collagen synthesis by human cataract lens epithelial cells [J]. *Br J Ophthalmol*, 1996, 80 (1): 63-68.
- 9 Wederell ED, Brown H, O'Connor M, Chamberlain G, McAvoy JW, de Iongh RU. Laminin-binding integrins in rat lens morphogenesis and their regulation during fibre differentiation [J]. *Exp Eye Res*, 2005, 81 (3): 326-339.
- 10 张艳, 王继红, 刘欣, 李庆伟. 以整合素为作用靶点的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸模体毒素研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2009, 36 (6): 406-411.
- 11 Kim JT, Lee DH, Chung KH, Kang IC, Kim DS, Joo CK. Inhibitory effects of salmosin, a disintegrin, on posterior capsular opacification *in vitro* and *in vivo* [J]. *Exp Eye Res*, 2002, 74 (5): 585-594.
- 12 姬翔, 梁皓, 李霞, 陈金卯, 黄敏丽, 何剑峰, 等. 去整合素抑制兔晶状体上皮细胞增殖的实验研究 [J]. *眼科新进展*, 2010, 30 (4): 304-307.
- 13 范鹏举, 李珍, 黄晓元. Echistatin 对人增生性瘢痕成纤维细胞的作用研究 [J]. *中国医学工程*, 2007, 15 (6): 469-472.
- 14 翁景宁, 张惠蓉. bcl-2 基因和增殖细胞核抗原在人晶状体上皮细胞中的表达 [J]. *中华眼科杂志*, 2001, 37 (3): 197-199.