论著

文章编号:1000-5404(2005)08-0764-03

角膜酸烧伤后新生血管形成与上皮缺损和白细胞渗出关系的初步研究

王 红,谢汉平,殷 旭,刘志敏 (第三军医大学全军西南医院眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究大鼠角膜酸烧伤后新生血管形成与角膜上皮缺损和白细胞渗出的关系。**方法** 建立轻、中、重度大鼠角膜酸烧伤新生血管模型,裂隙灯下动态观察角膜上皮缺损直径及新生血管形成情况,计算新生血管的面积与角膜面积的比例;各组分别于烧伤后不同时间点取眼球行HE染色,光镜下计算角膜白细胞浸润的数量。采用Pearson相关分析法分析新生血管形成与上皮缺损和白细胞浸润的关系。**结果** 角膜不同程度酸烧伤后上皮愈合速度不同,损害程度越重上皮愈合越慢。烧伤后可引起白细胞渗出,烧伤程度越重白细胞渗出越明显,有显著的差异($P<0.01$)。轻度酸烧伤角膜未见新生血管形成,中重度酸烧伤在伤后第3天可观察到新生血管形成。不同程度酸烧伤新生血管形成有显著的差异($P<0.01$)。酸烧伤后新生血管形成与上皮缺损($r=0.330\,0$, $P<0.01$)及白细胞渗出($r=0.177\,9$, $P<0.05$)有显著的相关性。**结论** 大鼠角膜酸烧伤后CNV的发生与烧伤程度与角膜上皮缺损和白细胞渗出有密切关系。

关键词:角膜;上皮;新生血管;白细胞;酸烧伤

中图法分类号:R364.3;R772.202 **文献标识码**:A

Preliminary study of the correlation of neovascularization in cornea after cautery with acid and the epithelial defect, the infiltrating of leucocytes

WANG Hong, XIE Han-ping, YIN Xu, LIU Zhi-min (Ophthalmology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between corneal neovascularization (CNV) in rat after cautery with acid and the defect in epithelium, the infiltrating of leucocytes. **Methods** The model of mild, moderate and severe acid burn in rat cornea was established. Corneal angiogenesis and the diameter of the epithelial defect were observed with a slit lamp microscope. The ratio of neovascularization area to that of cornea was calculated. The specimens were taken to stain with hematoxylin and eosin (HE) at different time points after cautery and the number of the leucocytes in cornea was calculated with light microscope. The relation between CNV and the diameter of epithelial defect and the infiltrating leucocytes in cornea was analyzed with Pearson's correlation. **Results** The healing of epithelium differed with different degree of acid burn. The more damage the eye suffered, the more time it would take to heal. Leucocytes infiltrated in cornea after cautery. The more damage the eye suffer, the more leucocytes can be observed, and the statistical difference was significant ($P<0.01$). N CNV could be observed in moderately-burned and severely-burned cornea at day 3 after cautery. The statistical difference of CNV among mildly-burned, moderatedly-burned and severely-burned cornea was significant ($P<0.01$). There was significant correlation between CNV and epithelial defect ($r=0.330\,0$, $P<0.01$), and the infiltrating of leucocytes($r=0.177\,9$, $P<0.05$). **Conclusion** The CNV in rat after cautery with acid was related with the degree of burn, the epithelial defect and the infiltrating of leucocytes.

Key words: cornea; epithelium; neovascularization; leucocytes; acid burn

眼部化学烧伤为临床常见病,常造成角膜新生血管形成(corneal neovascularization, CNV),使视力丧失,并因高的排斥反应使后续的角膜移植的成功率大为降低。文献对碱烧伤引起的新生血管报道较多,而酸烧伤所致的角膜新生血管研究较少,为此,我们复制大鼠角膜酸烧伤模型,观察其发生、发展过程,并初步探讨

基金项目:国家"十五"科技攻关计划课题(2004 BA720A15)
Supported by the "Tenth Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of China (2004 BA720A15)

作者简介:王 红(1969-),女,广西省南宁市人,硕士研究生,主治医师,主要从事眼表疾病方面的研究,现在解放军第303医院。电话:(023)68772995

通讯作者:谢汉平,电话:(023)68765377

收稿日期:2005-01-21;修回日期:2005-03-28

其可能的影响因素。

1　材料与方法

1.1　动物模型制作

选健康 Longevans 大鼠 76 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心)，鼠龄 10～12 周，体质量 220～250 g，雌雄各半。将动物完全随机分为 4 组，正常对照组($n=4$)，Ⅰ组(轻度烧伤，$n=24$)，Ⅱ组(中度烧伤，$n=24$)，Ⅲ组(重度烧伤，$n=24$)。模型制作参考文献[1]并作修改，烧伤程度按国际通用 Hughes 分度法，双眼同时烧伤。“速眠新Ⅱ号”注射液[长春军需大学兽医研究所，吉兽药试字(2001)005004](0.1 ml/100 g)肌肉注射全身麻醉，1%“地卡因”表麻 1 次。以直径 5 mm 圆形滤纸浸入 1 mol/L 硫酸溶液 30 s，取出后于吸水纸上除去过多液体，并轻压滤纸中央使成凹面，然后将滤纸片贴于角膜中央，Ⅰ组烧灼时间为 30 s，Ⅱ组 1 min，Ⅲ组 2 min，取下滤纸后立即用灭菌生理盐水冲洗结膜囊 1 min。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组按烧伤后 1、3、7、14、21、28 d 分 6 个时相点，每个时相点 4 只大鼠。

1.2　裂隙灯显微镜观察

于造模后 1、3、7、14、21、28 d Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组分别以 1%荧光素钠行角膜染色，裂隙灯显微镜下观察角膜上皮缺损直径及新生血管生长情况并照相。

1.3　组织病理学观察

每次裂隙灯显微镜检查后，各组按完全随机抽取 4 只大鼠，颈椎脱臼法处死，迅速摘除眼球，放入 4%多聚甲醛中固定，1 d 后取出，常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片 HE 染色，光镜下观察角膜白细胞渗出情况。每张切片在高倍镜下(400 倍)随机选取角膜中央、旁中央(两侧)及角膜缘(两侧)共 5 个视野拍照。

1.4　计算机图像分析

采用 Image-Pro plus 4.5 图像处理软件在每只眼球照片上随机选取 1/4 角膜扇形面，分别测定角膜扇形面积及其中新生血管的面积，然后计算新生血管面积与角膜面积的比例，各组每个时相点计算 8 只眼球，求其平均值；同时以该软件测定角膜白细胞数，即将每个眼球 HE 染色的 5 张角膜照片进行白细胞计数，取其平均值作为该标本的白细胞数，各组每个时相点计算 8 只眼球，求其平均值。

1.5　统计学分析

各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单变量方差分析和均数间的多重比较，上皮缺损和白细胞浸润与新生血管间的关系采用 Pearson 相关分析。

2　结果

2.1　裂隙灯显微镜观察

Ⅰ组未见角膜新生血管生长，Ⅱ、Ⅲ组于造模后 3 d 可见新生血管生长，7 d 达高峰，各时相点 3 组新生血管比较差异有非常显著的意义($P<0.01$)，见表 1。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组酸烧伤造模后即刻均可见与滤纸片大小的上皮缺损区，Ⅰ组上皮愈合时间为 3 d，Ⅱ组为 7 d，Ⅲ组为 21 d，各组角膜上皮缺损直径比较差异有非常显著的意义($P<0.01$)，见表 2。

表 1　新生血管面积与角膜面积的比例[$n=8$，($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 1　Ratio of neovascularization area to that of cornea [$n=8$，($\bar{x}\pm s$)%]

Group	Time					
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Ⅰ	0	0	0	0	0	0
Ⅱ	0	3.65±0.38★	15.76±1.43★	9.68±0.95★	6.10±0.57★	4.15±0.37★
Ⅲ	0	9.18±0.92★△	37.58±2.70★△	36.08±2.84★△	32.19±4.02★△	28.83±2.00★△

$F=175.152$，★：$P<0.01$，*vs* Ⅰ；△：$P<0.01$，*vs* Ⅱ

表 2　角膜酸烧伤后上皮缺损直径($n=8$，mm)

Tab 2　Diameter of epithelial defect after cautery with acid ($n=8$，mm)

Group	Time					
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Ⅰ	2.8±0.17	0	0	0	0	0
Ⅱ	3.5±0.19★	2.0±0.15★	0	0	0	0
Ⅲ	4.4±0.21★△	3.5±0.20★△	2.5±0.12★△	1.0±0.10★△	0	0

$F=73.010$，★：$P<0.01$，*vs* Ⅰ；△：$P<0.01$，*vs* Ⅱ

2.2　光镜检查

正常对照组角膜未见任何白细胞。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组烧伤后均可见炎症细胞浸润，白细胞数随着烧伤程度加重而增多，各时相点白细胞数比较差异有非常显著的意义($P<0.01$)，见表 3。烧伤后 3 d，Ⅱ、Ⅲ组可见新生血管管腔，位于上、中 1/3 角膜基质层。

表 3　角膜酸烧伤后白细胞浸润数($n=8$，个/高倍视野)

Tab 3　The infiltrating leucocytes in cornea after cautery with acid ($n=8$，cells/high-power field)

Group	Time					
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Ⅰ	36.8±3.3	12.2±1.1	0	0	0	0
Ⅱ	85.5±6.7★	141.6±10.6★	44.9±3.5★	18.8±1.9★	0	0
Ⅲ	128.1±12.1★△	601.1±42.6★△	253.7±23.5★△	81.8±7.4★△	18.5±1.6★△	0

$F=2\,690.55$，★：$P<0.01$，*vs* Ⅰ；△：$P<0.01$，*vs* Ⅱ

2.3　新生血管与角膜上皮缺损和白细胞渗出的关系

将新生血管面积与角膜上皮缺损直径和渗出白细胞数量进行 Pearson 相关分析，结果为新生血管面积与角膜上皮缺损直径呈显著性正相关($r=0.330\,0$，$P<0.01$)，新生血管面积与渗出白细胞数呈显著性正相关($r=0.177\,9$，$P<0.05$)。

3　讨论

正常角膜呈透明状，无血管，在病理状态下，毛细血管进入角膜周边部 1～2 mm 以上即称为角膜新生血管(corneal neovascularization，CNV)。CNV 降低了角膜的透明度，使视力下降甚至失明，并且改变了角膜的免疫赦免地位，大大降低了角膜移植的成功率。CNV 发

生的机制尚不完全清楚。此方面的研究包括缺氧学说,白细胞介导学说,细胞因子平衡学说等。既往的研究多用角膜碱烧伤模型,由于碱性物质与组织发生皂化反应,形成的产物具有双相溶解度,既能水溶又能脂溶,在去除致伤因素后,损伤仍继续向深部扩展,使烧伤深度难以估计。本实验采用角膜酸烧伤模型,因酸性物质对组织蛋白的凝固作用,形成屏障阻止其向深层渗透,在去除致害物质后,组织的直接损伤不再扩展,损伤深度较易控制。

本实验表明角膜烧伤程度不同,上皮愈合时间亦不同(轻度 3 d,中度 7 d,重度 21 d)。轻度烧伤仅角膜上皮细胞的损伤,由于角膜上皮的再生能力很强,故修复时间短,无新生血管生长;中、重度烧伤,特别是重度烧伤,损伤波及基底膜、前弹力层(Bowman's 膜)、基质层、后弹力层(Descemet's 膜)甚至内皮细胞层[2],上皮细胞在增殖和迁徙的过程中,缺乏健康的细胞外基质的支持,新生的角膜上皮则粘附不牢,甚至反复脱落,故修复时间长,并伴有新生血管的生长。随着角膜上皮的修复新生血管的生长亦随之停滞,统计学显示角膜上皮缺损与新生血管生长有一定的相关性。这可能与角膜上皮细胞在增殖过程中分泌一些促血管生长的因子有关[3]。Eliason(1985)的实验亦说明了角膜上皮损伤后具有促进新生血管生长的作用。

另一个与新生血管相关的是角膜组织中白细胞的浸润。Shaw 等[4]通过腹膜内注射 Gr-1 抗体诱导小鼠血循环白细胞减少,然后在角膜植入 rFGF2 缓释丸,结果角膜新生血管较对照组显著减少。国内丁正平等[5]研究发现在新生血管形成前角膜组织已有较多炎症细胞浸润,电镜显示角膜新生血管周围可见中性粒细胞浸润及其崩解产物。以上实验均说明白细胞在角膜新生血管形成中起重要的介导作用。本研究结果显示,在造模后第 1 天,角膜缘有较多炎症细胞浸润,部分进入角膜基质层,此时角膜未见任何新生血管。在烧伤后 7 d 新生血管生长达高峰,而炎症细胞浸润在伤后 3 d 即达高峰。炎症细胞促使角膜血管形成可能与其释放一些血管生长因子及炎性细胞因子,如 VEGF、bFGF、TGF 及 IL-1 等有关[3,6,7]。

本实验显示重度酸烧伤角膜中有大量白细胞浸润。由于白细胞在吞噬过程中发生呼吸爆破,产生大量超氧阴离子自由基,诱发脂质过氧化反应,使角膜细胞外基质成分降解,特别是纤维连结蛋白的降解,使角膜上皮的再生受到了抑制[8]。反过来,上皮的缺损使角膜丧失了抵御致害物质的重要屏障,加重了炎症细胞的浸润[9]。角膜的细胞浸润与上皮缺损互为因果,共同促进了角膜新生血管的发展。

我们的资料显示角膜中、重度烧伤,随着烧伤程度的加重,白细胞浸润的数量增多,新生血管形成的面积亦增多,白细胞浸润与新生血管面积呈一定的量-效关系。而轻度烧伤仅角膜缘有少量炎性细胞浸润,上皮愈合快,角膜未见新生血管,可能与促新生血管形成的生长因子蛋白未达到一定的量、作用时间短[6]或是新生血管形成因素与抑制因素的平衡[10]尚保持完好,此点有待进一步研究。

参考文献:

[1] 李 雪,徐锦堂,崔 浩. 兔眼碱、酸、热烧伤后蛋白抗原性变化的研究[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2003, 25(3): 149-151.

[2] 李凤鸣. 眼科全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 3359-3361.

[3] Cursiefen C, Rummelt C, Kuchle M. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor alpha, and transforming growth factor beta1 in human corneas with neovascularization [J]. Cornea, 2000, 19(4): 526-533.

[4] Shaw J P, Chuang N, Yee H, *et al*. Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis *in vivo*[J]. J Surg Res, 2003, 109(1): 37-42.

[5] 丁正平,何玉兰,魏厚仁,等. 实验性角膜新生血管形成的形态学研究[J]. 中华眼科杂志, 1995, 31(1): 49-51.

[6] Edelman J L, Castro M R, Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40 (6) : 1112-1123.

[7] Yoshida S, Yoshida A, Matsui H, *et al*. Involvement of macrophage chemotactic protein-1 and interleukin-1 beta during inflammatory but not basic fibroblast growth factor-dependent neovascularization in the mouse cornea [J]. Lab Invest, 2003, 83(7): 927-938.

[8] 钱 颖,吴静安. 氧自由基在实验性角膜炎中的作用[J]. 中华眼科杂志, 1998, 34(2): 149-151.

[9] Gan L, Hamberg Nystrom H, Fagerholm P, *et al*. Cellular proliferation and leukocyte infiltration in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy[J]. Acta Ophthalmol Scand, 2001, 79(5): 488-492.

[10] Kure T, Chang J H, Kato T, *et al*. Corneal neovascularization after excimer keratectomy wounds in matrilysin-deficient mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(1): 137-144.

(编辑 栾 嘉)