论著

文章编号:1000-5404(2005)17-1776-02

羊膜细胞培养液对兔角膜重度碱烧伤房水中 TNF-α 和 IL-1 的影响

严灿荣,梁轩伟,李瑞庄,郑 彪,宋洪妮 (广东医学院附属医院眼科,湛江 524001)

提 要:目的 探讨羊膜细胞培养液治疗兔眼重度碱烧伤的机制,为临床应用提供理论依据。**方法** 采用中国大白兔72只,随机分成对照组(A组)24只,0.1%地塞米松治疗组(B组)24只,羊膜上皮细胞培养液治疗组(C组)24只。各组动物采用单眼建立角膜碱烧伤模型并分别以0.1%地塞米松液和羊膜细胞提取液对B、C组动物伤眼进行治疗。于伤后1、3、7、14 d活杀动物。每个时段各组分别活杀6只兔,取眼房水检测TNF-α、IL-1的含量与活性。**结果** 各时段B、C治疗组与对照组相比TNF-α、IL-1的活性和含量明显降低($P<0.01$)。**结论** 抑制TNF-α和IL-1的生物合成和释放可能是羊膜细胞培养液治疗角膜碱烧伤的机制之一。

关键词:羊膜;角膜;碱烧伤;肿瘤坏死因子;白细胞介素-1

中图法分类号:R776.1 **文献标识码**:A

Effect of extract of human amniotic cells on expression of TNF-α and IL-6 in aqueous humor after rabbit corneal alkali burn

YAN Can-rong, LIANG Xuan-wei, LI Rui-zhuang, ZHENG Biao, SONG Hong-ni (Department of Ophthalmology, The Affliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic mechanism of extract of human amniotic cells in treating rabbit corneal alkali burn and to provide the rational evidence for its clinical application. **Methods** The rabbit model of corneal alkali burn was established by 0.5mol/L sodium hydroxide to one eye of each rabbit. All 72 rabbit models were randomly divided into 3 groups as control group, 0.1% Dex group and human amniotic cells extract group. TNF-α, IL-1 were detected in aqueous humor at day 1, 3, 7, 14 after burn. **Results** As compared with control group, the expression of TNF-α, IL-1 were obviously lower in the groups treated with 0.1% Dex or human amniotic cells extract ($P<0.01$). There was no statistical difference in TNF-α, IL-1 levels between 0.1% Dex group and human amniotic cells extract group. **Conclusion** Inhabiting the biosynthesis and release of TNF-α, IL-1 is the possible mechanism of human amniotic cells extract in managing the rabbit corneal alkali burn.

Key words: amniotic epithelial cell; cornea; alkali burn; tumor necrosis factor-α; inerleukin-1

角膜碱烧伤是一种常见的眼科疾病,其致盲率甚高,目前许多研究表明,其病理过程与炎性细胞因子,如白细胞介素-1、6、8和肿瘤坏死因子有关。角膜碱烧伤引起的眼表面病变,包括角膜上皮持续性缺损、角膜溃疡等,既往虽可用角、结膜移植,但由于免疫排斥、感染、瘢痕增生等原因,常导致手术失败[1]。近年来羊膜移植在眼表烧伤方面应用的研究日益受到人们的重视,但羊膜细胞培养液对碱烧伤治疗的研究少见报道。本研究采用羊膜细胞培养液对兔重度角膜碱烧伤后进行治疗并对房水中的肿瘤坏死因子(tumor ecrosis factor-α,TNF-α)和白细胞介素-1(interleukin-1,IL-1)含量变化进行检测,旨在从免疫学角度为临床应用提供理论依据。

作者简介:严灿荣(1964-),男,广东省阳春市人,副主任医师,主要从事眼科临床方面的研究。电话:(0759)2387425

收稿日期:2005-02-05;**修回日期**:2005-05-04

1 材料与方法

1.1 羊膜细胞培养液的制备

羊膜细胞的制备参考文献[3]的方法:由正常健康产妇经剖腹产获得的新鲜羊膜,用含有抗生素的PBS和DMEM培养液各清洗3次,取羊膜,置100 mm培养皿,上皮面向上,加少许0.02% EDTA,置于37℃孵箱2 h,以松解细胞之间的粘附。培养皿中加入DMEM培养液,用细胞刮器轻轻刮下羊膜上皮细胞,收集细胞悬液,以1 000 r/min。离心5 min,去上清,沉淀细胞以DMEM冲洗1次,于6孔培养板以含10%胎牛血清的EGM培养液培养,细胞至90%以上融合生长后EGM冲洗3次,并换成EGM基础培养液(1 ml/孔)继续培养48 h,为实验用羊膜细胞培养液。收集培养液,以备实验用。

1.2 实验动物分组

选择中国大白兔(由广东医学院动物实验中心提供)72只,体质量1.5~2.5kg,雌雄不限,随机分成实验对照组(A组)24只动物(24眼),0.1%地塞米松治疗组(B组)24只动物(24眼),羊膜上皮细胞培养液组(C组)24只动物(24眼)。每组分

伤后 1、3、7、14 d 4 个时段活杀动物进行取房水，每个时段活杀 6 只动物(6 眼)。

1.3　兔眼角膜重度碱烧伤模型的建立及治疗方法

角膜重度碱烧伤模型建立及标准参照文献[4]的方法，采用单眼致伤 5% 用戊巴比妥钠兔耳缘静脉麻醉 50 mg/kg。以 1% Alcaine 滴眼表面麻醉，以浸有 0.5 mol/L NaOH 溶液的直径为 6 mm 的 3 层镜头纸片置于兔角膜表面，1 min 后取下。快速用生理盐水冲洗结膜囊。在 A、B、C 组伤后分别用等渗盐水、0.1% 地塞米松液、羊膜细胞培养液滴眼，1 次/15 min，4 次后改为 1 次/6 h，4 次/d 滴眼。

1.4　标本的采集

取建模损伤后具体时段兔眼房水 0.2 ml，置于 -20 ℃冷藏，分别取 0.1 ml，用 ELISA 双层夹心法检测 TNF-α，用 MTT 比色法检测 IL-1。

1.5　统计学处理

测得数据的统计分析采用 SAS 8.22 统计学软件进行完全随机设计方差分析，再用 Student-Newman-Keuls 法进行均数间的两两比较。

2　结果

术后各组不同时段兔伤眼房水 TNF-α 含量和 IL-1 活性见表 1、2。兔眼碱烧伤后房水中 TNF-α 含量和 IL-1 活性两药物治疗组与对照组比较，伤后 1、3、7、14d 有显著性差异($P < 0.01$)，两药物治疗组 TNF-α 含量和 IL-1 活性明显低于实验对照组。B 组和 C 组 TNF-α 含量和 IL-1 活性伤后 1、3、7、14 d 的变化相比较，无显著性差异($P > 0.05$)。

表 1　兔眼碱烧伤后房水 TNF-α 含量变化($n=6$, $\bar{x} \pm s$, μg/L)

Tab 1　TNF-α level in aqueous humor after rabbit cornea alkali burn($n=6$, $\bar{x} \pm s$, μg/L)

Group	TNF-α level in aqueous humor			
	1 d	3 d	7 d	14 d
A	47.80 ± 1.79	45.07 ± 1.21	98.21 ± 8.09	51.62 ± 1.98
B	17.78 ± 1.20	15.55 ± 0.74	16.65 ± 2.78	17.29 ± 0.92
C	16.76 ± 0.99	17.21 ± 1.33	15.50 ± 1.71	16.64 ± 0.76

表 2　兔眼碱烧伤后房水 IL-1 活性变化($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　IL-1 activity in aqueous humor after rabbit cornea alkali burn ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Absorbance (A value)			
	1 d	3 d	7 d	14 d
A	0.335 9 ± 0.006 2	0.375 6 ± 0.004 2	0.466 9 ± 0.007 5	0.333 7 ± 0.003 6
B	0.208 1 ± 0.001 2	0.217 9 ± 0.001 1	0.220 4 ± 0.001 4	0.234 2 ± 0.001 5
C	0.199 7 ± 0.000 7	0.210 3 ± 0.001 4	0.229 8 ± 0.002 0	0.230 8 ± 0.001 7

3　讨论

眼部遭受热烧伤或化学烧伤，会导致患者视功能受到极大的影响。在重度碱烧伤早期，组织缺血和广泛坏死，大量多形核白细胞的浸润，进行性眼内炎症的发生，增加了对眼内组织的损伤。采用自体或异体角结膜移植，存在一个感染及免疫排斥的问题。近年的临床研究证实，羊膜具有抑制炎症的作用，羊膜基质能促使白细胞凋亡而消除炎症，羊膜上皮细胞分泌的细胞因子能抑制炎症细胞活化，减少炎性介质的产生及抑制其活化，并抑制角膜新生血管形成[5,6]。

本实验研究显示角膜重度碱烧伤后导致血-房水屏障破坏，隐匿抗原释放，炎症细胞进入前房，入侵的炎细胞分泌多种免疫和炎症反应介质，使得 IL-1，TNF-α 等细胞因子相继出现，造成眼内强烈的炎症反应而引发免疫损伤有关。采用 0.1% 地塞米松及羊膜细胞培养液治疗角膜碱烧伤 1，3，7，14 d 后，房水中 TNF-α 含量和 IL-1β 活性均明显降低，说明早期应用 0.1% 地塞米松及羊膜上皮细胞培养液能明显地抑制了房水中 TNF-α 和 IL-1 的产生，从而有效地减轻内眼炎症反应。采用羊膜细胞培养液治疗后，角膜碱烧伤房水中 TNF-α 的含量和 IL-1 活性尽管与 0.1% 地塞米松治疗组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)，但局部应用皮质类固醇激素可引起病理性高眼压或激素性青光眼、晶体混浊，诱发或加重感染或使角膜发生溶解，甚至使全身代谢及免疫功能紊乱[2]。与皮质类固醇激素相比，羊膜细胞培养液不存在上述副作用，同时又具有镇痛、减轻角膜混浊等优点。

研究证明，在角膜碱烧伤早期房水中 TNF-α 和 IL-1β 含量显著增加，其炎性反应同 TNF-α 和 IL-1 等炎性细胞因子具有相关性[7]，因此，在角膜碱烧伤早期阻止炎症因子的释放和炎症细胞的侵入，减轻内眼炎症反应，是提高角膜碱烧伤治愈率，减少并发症的关键。羊膜细胞培养液对 TNF-α 及 IL-1 的抑制作用可能同羊膜细胞培养液中大量有活性的羊膜上皮细胞所分泌的细胞因子有关，其有助于角膜上皮的增殖和移行，增强角膜组织清除炎症介质的能力，减轻炎症反应。本实验结果表明羊膜细胞培养液可以减少房水中 TNF-α 和 IL-1 的活性和含量，提示角膜碱烧伤后早期应用羊膜细胞培养液可抑制房内炎性细胞因子的产生，从而达到有效抑制角膜内急性炎症反应，因而羊膜细胞培养液对防治角膜损伤相关性眼病，具有明显的潜在临床应用价值，值得进一步研究。

参考文献：

[1] Williams K A, Roder D, Esterman A, *et al*. Factors predictive of corneal graft survival. Report from the Australian corneal graft registry [J]. Ophthalmology, 1992, 99(3): 4.3 -414.

[2] Lu K L, Wee W R, Sakamoto T, *et al*. Comparison of *in vitro* antiproliferative effects of steroids and nonsteroidal antiinflammatory drugs on human keratocytes[J]. Cornea, 1996, 15(2): 185 -190.

[3] 马　翔，HaydeeBazan，李　军. 羊膜培养液抑制角膜新生血管的实验研究[J]. 中华眼科杂志，2003，39(12)：753 -756.

[4] 全国眼外伤职业眼病学组. 眼部烧伤分度标准[J]. 眼外伤职业眼病杂志，1983，5：封 3.

[5] Meller D，Tseng S C. Conjnctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，1999，40(7)：878 -886.

[6] Kobayashi N，Kabuyama Y，Sasaki S，*et al*. Suppression of comeal neovascularization by culture supernatant of human amniotic cells[J]. Cornea，2002，21(1)：62 -67.

[7] 李　雪. 角膜碱烧伤的免疫机制[J]. 眼科研究，2001，19(3)：278 -280.

（编辑　薛国文）