文章编号:1000-5404(2006)07-0659-03

论著

大鼠角膜不同程度酸烧伤后MDA与SOD变化特征的实验研究

王 红[1],陈国勇[2],赵长霖[1],谢汉平[1] ([1]第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038;[2]解放军303医院眼科,南宁 530021)

提 要:目的 探讨不同程度酸烧伤后角膜组织的继发性损害与氧化损伤的关系。**方法** 建立轻、中、重度大鼠角膜酸烧伤模型,应用硫代巴比妥酸法(TBA法)及化学比色法检测丙二醛(malonaldehyde, MDA)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)在酸烧伤后不同时期角膜内的含量。**结果** 轻度酸烧伤MDA及SOD无明显变化;中度酸烧伤MDA轻度升高,SOD无明显变化;重度酸烧伤MDA含量升高,而SOD活力下降。**结论** 自由基生成与清除之间的平衡状态的破坏可能是重度酸烧伤角膜的各种继发性损害的原因之一。

关键词:角膜;酸烧伤;丙二醛;超氧化物歧化酶
中图法分类号:R446.8; R644; R779.13 **文献标识码**:A

Change of MDA and SOD in rat cornea exposed to acid burn

WANG Hong[1], CHEN Guo-yong[2], ZHAO Chang-lin[1], XIE Han-ping[1] ([1]Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]No. 303 Hospital of PLA, Nanning 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of oxidative damage with the secondary lesion in acid-burnt cornea. **Methods** The model of mild, moderate and severe acid burn in rat cornea was established in 72 Long-Evans rats, Four served as normal control. The content of corneal malonaldehyde (MDA) was determined by thiobarbituric acid test (TBA) and the activity of corneal superoxide dismutase (SOD) was detected by chemical colorimetry test at day 1, 3, 7, 14, 21, 28 after acid burn. **Results** No obvious change of MDA and SOD in the mildly-burnt cornea, MDA increased slightly and SOD was of no obvious change in the moderately-burnt cornea, MDA increased and SOD decreased in the severely-burnt cornea significantly. **Conclusion** The breakage of the balance between the generation and elimination of free radical is possible reason why the secondary lesion occurs in severely-burnt cornea.

Key words: cornea; acid burn; malonaldehyde; superoxide dismutase

我们在临床治疗中常常发现,角膜轻度酸烧伤愈合快,愈后好,而随着烧伤程度的加重,常出现角膜上皮延迟愈合,角膜溃疡、穿孔以及大量新生血管形成等继发性损害,造成视力甚至眼球丧失。目前,重症病例尚无特效治疗,原因与酸烧伤后角膜的损伤机制不明有关。为此,本实验制作轻、中、重度角膜酸烧伤模型,于烧伤后动态观察角膜的损伤变化,并检测角膜组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力,初步探讨不同程度酸烧伤后角膜组织的继发性损害与氧化损伤的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作

选健康Long-Evans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,$n=24$)。模型制作按参考文献[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

基金项目:国家"十五"科技攻关计划课题(2004 BA720A15)
Supported by the Key Sci & Tech Research Foundation of the National "Tenth Five-Year Plan" (2004 BA720A15)
作者简介:王 红(1969-),女,广西壮族自治区南宁市人,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303医院眼科。电话:(023)68772995
通讯作者:谢汉平,电话:(023)68765377,E-mail:xiehanping@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-09-21;**修回日期**:2006-01-10

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组按烧伤后的时间分为1、3、7、14、21、28 d共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实验组以裂隙灯显微镜下观察角膜的损害表现,并以1%荧光素钠行角膜染色,观察上皮愈合速度。

1.3 角膜组织MDA含量和SOD活力的测定

裂隙灯显微镜检查后,摘除眼球,解剖显微镜下沿角膜缘全周剪下角膜,用电子分析天平称重后,将角膜组织剪碎,再用生理盐水(0~4 ℃)按1∶19稀释成5%组织匀浆,超声波细胞粉碎机在冰浴下破碎细胞,蛋白质含量测定按考马斯亮蓝法,MDA含量测定用硫代巴比妥酸(TBA)法,SOD活性测定用化学比色法,用Ultrospec 430pro紫外-可见分光光度计测定,具体方法均按南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书操作。

1.4 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,MDA与SOD值的关系采用Pearson相关分析。

2 结果

2.1 裂隙灯显微镜观察

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,轻度酸烧伤角膜上皮愈合最快(3 d),愈合后角膜透明,无新生血管侵入;中度酸烧伤上皮愈合减慢(7 d),角膜无溃疡及穿孔发生,愈合后遗留角膜薄翳及少量新生血管;而重度酸烧伤上皮愈合明显延迟(21 d),并于烧伤后第7天出现角膜溃疡,有3只眼出现穿孔,角膜混浊、水肿明显,大量新生血管形成。

2.2 MDA含量的变化

正常角膜MDA含量为(2.04±0.19) nmol/mg,伤后的第1~28天,轻度酸烧伤组角膜组织中MDA的含量与对照组相比,均未见差异($P>0.05$),而中度烧伤组高于轻度烧伤组,重度烧伤组高于轻度烧伤组和中度烧伤组,有非常显著的统计学差异($P<0.01$),见表1。

表1 角膜酸烧伤后MDA含量的变化(nmol/mg, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间(d)					
		1	3	7	14	21	28
Ⅰ	8	2.33±0.30	1.98±0.18	2.19±0.21	1.97±0.18	1.81±0.16	2.06±0.22
Ⅱ	8	4.65±0.59[a]	5.57±0.41[a]	4.22±0.40[a]	2.90±0.27[a]	2.60±0.16[a]	2.88±0.25[a]
Ⅲ	8	8.1±0.70[ab]	9.18±0.85[ab]	11.68±0.85[ab]	8.53±0.90[ab]	4.84±0.51[ab]	3.37±0.33[ab]

$F=216.965$. a: $P<0.01$,与Ⅰ组比较; b: $P<0.01$,与Ⅱ组比较

2.3 SOD含量的变化

正常角膜SOD含量为(29.8±2.2) U/mg,烧伤后的1~28 d,轻度烧伤组、中度烧伤组SOD含量与对照组相比,均无显著性差异($P>0.05$)。重度烧伤组SOD含量下降,伤后第1天与轻度烧伤组之间即有显著差异($P<0.01$),伤后第3、7、14天与轻度烧伤组、中度烧伤组之间,差异非常显著($P<0.01$),伤后第21天与中度烧伤组之间有显著差异($P<0.01$),见表2。

表2 角膜酸烧伤后SOD含量的变化(U/mg, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间(d)					
		1	3	7	14	21	28
Ⅰ	8	27.02±1.48	31.32±3.94	28.74±1.85	30.35±2.39	29.46±2.84	28.83±2.22
Ⅱ	8	23.18±2.02	21.43±1.71	35.54±3.58	34.53±3.62	33.68±2.45	30.05±3.28
Ⅲ	8	21.68±2.48[a]	14.56±1.61[ab]	11.34±1.01[ab]	22.03±1.53[ab]	29.57±2.77[a]	30.44±2.67

$F=41.195$. a: $P<0.01$,与Ⅰ组比较; b: $P<0.01$,与Ⅱ组比较

2.4 MDA与SOD相关性分析

酸烧伤后,轻度烧伤组MDA及SOD含量与正常对照组相比未见变化;中度酸烧伤组MDA含量轻度升高,SOD含量无变化;重度酸烧伤组MDA含量升高,并以7 d达高峰,而SOD含量下降,以7 d达最低,Pearson相关分析显示MDA与SOD呈负相关($r=-0.7926$, $P<0.01$)。

3 讨论

本实验使用相同大小的滤纸片,根据烧灼时间不同,制作了轻、中、重度大鼠角膜硫酸烧伤模型,结果显示,虽然烧灼面积一样,但烧伤深度的差异使角膜上皮的愈合速度表现出很大的差别,并在修复过程中出现

了不同程度的损害。已经知道，酸性物质通过对组织蛋白的凝固作用而造成组织的损伤，那么，它的继发性损害又是通过什么途径引起的呢？

我们的前期研究显示[2]，轻度酸烧伤，仅角膜缘有少量白细胞出现，中度酸烧伤，白细胞浸润量增多，而重度酸烧伤角膜出现大量白细胞的浸润。尽管炎性细胞浸润可起到清除和灭活有毒物质的作用，是机体自身保护的重要环节，但炎性细胞产物往往会非特异性地造成组织的破坏。实验证明，白细胞在吞噬过程中和被可溶性物质激活时，会产生呼吸爆破，其特征是使氧消耗增加，己糖旁路激活，产生高毒性的氧自由基及其代谢产物，造成组织的损伤[3,4]。

自由基反应的稳定产物为 MDA，因此通过测定 MDA 含量来表明实验中是否发生了自由基的升高。需氧组织在生理代谢过程中能产生活性氧类物质，但同时组织中也存在抗氧化防御系统，一经产生，很快被代谢为无害的终末产物，使自由基的生成与清除达到相对的动态平衡。但如果自由基生成过多，超过防御能力，或者生成并不过多，但机体防御系统有障碍，平衡状态就会被破坏，导致自由基的大量积累，从而引起组织损伤[5]。角膜抗自由基的主要酶是 SOD，广泛分布于角膜上皮及内皮中，基质中含量较少[6,7]。SOD 能特异性清除超氧阴离子，保护组织免受氧自由基的损害[8]。

本实验结果显示轻度酸烧伤时，MDA 与 SOD 未见明显变化，说明无自由基的升高，角膜的防御功能亦未受损；中度酸烧伤虽有 MDA 的轻度升高，但 SOD 含量无下降，说明虽有自由基的升高，但角膜的防御功能未受损伤；重度酸烧伤后第 1 天即出现角膜 MDA 的升高，并持续至伤后 28 d，同时 SOD 含量减少，并持续至伤后 21 d。说明角膜存在异常升高的自由基，SOD 由于烧伤时大量上皮组织的破坏而丢失，而且升高的自由基及其代谢产物可干扰蛋白质代谢，造成酶活性包括 SOD 活性的下降[9]，使自由基的生成和清除之间的平衡状态被打破。

我们的资料显示轻度酸烧伤后 MDA 与 SOD 无改变，上皮愈合快，愈合后角膜透明；中度酸烧伤虽有 MDA 的轻度升高，但 SOD 无改变，自由基的生成和清除之间的平衡状态未被打破，上皮愈合亦较快，角膜无溃疡发生；重度酸烧伤，MDA 显著升高，尤以伤后第 7 天升至高峰，同时出现了 SOD 的明显下降，尤以伤后第 7 天达最低，此时正是溃疡的高发期，从而提示过多的自由基和机体清除能力下降是导致酸烧伤后角膜溃疡不愈的原因之一。由于角膜内自由基的生成与其清除能力之间的平衡破坏，自由基升高的同时，无足够的 SOD 分泌来清除，则大量自由基通过对上皮的氧化作用抑制其再生，并通过对蛋白质、胶原和粘多糖的破坏作用降解细胞外基质（ECM），引起角膜溃疡乃至穿孔的发生[9]。

本研究表明重度酸烧伤后自由基的生成与清除之间的平衡状态的破坏可能是重度酸烧伤角膜各种继发性损害的原因之一。这可能为尽早防治重度酸烧伤后角膜的各种继发性损害提供新的途径，即可通过抑制自由基的生成（例如通过抑制炎症反应[10]）和/或增加自由基的清除能力（补充外源性 SOD 等[11]）以促进上皮的愈合，抑制角膜溃疡的发生发展，因此在重度酸烧伤的治疗上具有潜在的价值。

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] 王　红，谢汉平，殷　旭，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2005，27(8)：764－766.

[3] HAYASHI S, ISHIMOTO S, WU G S, *et al*. Oxygen free radical damage in the cornea after excimer laser therapy[J]. Br J Ophthalmol, 1997, 81(2): 141－144.

[4] MATSUMOTO K, SHIMMURA S, GOTO E, *et al*. Lecithin-bound superoxide dismutase in the prevention of neutrophil-induced damage of corneal tissue[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(1): 30－35.

[5] 李　纳，邹留河，董东升. 抗氧化物质与角膜碱烧伤[J]. 眼科，2002，11(4)：243－246.

[6] REDMOND T M, DUKE E J, COLES W H, *et al*. Localization of corneal superoxide dismutase by biochemical and histocytochemical techniques[J]. Exp Eye Res, 1984, 38(4): 369－378.

[7] BEHNDIG A, KARLSSON K, JOHANSSON B O, *et al*. Superoxide dismutase isoenzymes in the normal and diseased human cornea[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(10): 2293－2296.

[8] BEHNDIG A, KARLSSON K, BRANNSTROM T, *et al*. Corneal endothelial integrity in mice lacking extracellular superoxide dismutase [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(12): 2784－2788.

[9] 赵世来. 角膜碱烧伤基础研究与治疗[J]. 中国实用眼科杂志，2001，19(10)：734－736.

[10] DANDONA P, ALJADA A, GHANIM H, *et al*. Acute suppressive effect of hydrocortisone on p47 subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase[J]. Metabolism, 2001, 50(5): 548－552.

[11] SHIMMURA S, IGARASHI R, YAGUCHI H, *et al*. Lecithin-bound superoxide dismutase in the treatment of noninfectious corneal ulcers [J]. Am J Ophthalmol, 2003, 135(5): 613－619.

（编辑　薛国文）