文章编号:1000-5404(2006)11-1181-03

论著

大鼠角膜酸烧伤对角膜内皮细胞损伤和修复的实验观察

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 研究大鼠角膜酸烧伤对内皮细胞的损伤和影响内皮修复的因素。**方法** 建立轻、中、重度大鼠角膜酸烧伤模型,裂隙灯下动态观察角膜水肿、混浊及上皮愈合情况;各组于烧伤后不同时间点取角膜行内皮细胞台盼蓝-茜素红联合活细胞染色及HE染色,观察内皮细胞损伤、修复及白细胞浸润情况。**结果** 轻、中度酸烧伤角膜内皮细胞未见损伤改变,角膜少量白细胞浸润,上皮愈合及水肿消退均较快;重度酸烧伤损伤区内皮细胞坏死、脱落,修复期损伤周边区内皮细胞变形、伸长,向创面移行,角膜大量白细胞浸润,角膜上皮愈合延迟,水肿消退慢。**结论** 重度酸烧伤可直接造成角膜内皮细胞受损,继发性炎症反应参与了酸烧伤后角膜内皮细胞的损害;内皮细胞受损可使角膜溃疡及水肿迁延不愈。

关键词: 台盼蓝;茜素红;角膜;内皮细胞;酸烧伤
中图法分类号: R-332; R772.2; R779.13 **文献标识码**: A

Experimental study on rat corneal endothelial damage and repair after 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]Department of Ophthalmology, No. 303 Hospital of PLA, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of acid burn on rat corneal endothelial damage and its repair. **Methods** The model of mild, moderate and severe acid burn in cornea was established in 90 Long-Evans rats ($n=30$ for each degree of acid burn) with 4 rats served as normal controls. Corneal edema, opacity and the healing of epithelium were observed with a slit lamp microscope. The corneal endothelium from half rats of each degree acid burn was stained with trypan blue and alizarin red, and that from the other half with hematoxylin and eosin (HE) immediately, 30 min, 1, 3, 7, 14, 21, 28 d after cautery. The endothelial damage and its repair were observed and the number of the leucocytes in cornea was calculated under light microscope. **Results** No damage was seen in the corneal endothelial cells of mild, moderate acid burn, only a few leucocytes could be seen in the cornea, and the healing of epithelium, the regression of edema were within 7 d. The endothelial cells necrosed and shedded in the wound area by severe acid burn. The endothelial cells in the margin were deformed, elongated and slided to the damaged area during repair, and a great number of leucocytes infiltrated, the healing of corneal epithelium was delayed, the regression of edema was up to 28 d. **Conclusion** The corneal endothelial cells were damaged in severe acid burn. The secondary inflammatory reaction took part in the damage of corneal endothelial cells after severe acid burn. The damage of endothelial cells delayed the healing of corneal ulcer and edema.

Key words: trypan blue; alizarin red; cornea; endothelial cell; acid burn

角膜酸烧伤为临床常见外伤。轻度烧伤角膜愈合快,愈后好,而重度烧伤常常出现角膜的持续性水肿、混浊,甚至角膜变性、大泡性角膜炎等改变,造成视力严重受损,甚至因难以忍受疼痛行眼球摘除术。已知角膜内皮细胞起着屏障和泵功能的作用,酸烧伤后角膜的病变是否与内皮细胞的损伤有关,目前少见文献报道。为此,我们制作了轻、中、重度大鼠角膜酸烧伤模型,利用台盼蓝-茜素红联合活细胞染色法及HE染色法动态观察角膜内皮细胞的损伤和修复过程,探讨内皮细胞的损伤因素以及内皮细胞损伤与角膜病变的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作

选健康Long-Evans大鼠94只(购自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。将动物分为4组,正常对照组($n=4$),Ⅰ组(轻度烧伤,$n=30$),Ⅱ组(中度烧伤,$n=30$),Ⅲ组(重度烧伤,$n=30$)。模型制作方法及烧伤程度分度同前期研究[1]。

基金项目:国家"十五"科技攻关计划课题(2004BA720A15)
Supported by the "Tenth Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of China (2004BA720A15)
作者简介:王 红(1969-),女,广西壮族自治区南宁市人,硕士,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。电话:(023)68765377
通讯作者:谢汉平,电话:(023)68765377,E-mail: xiehanping@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-12-20;修回日期:2006-03-15

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组按烧伤后的时间分为烧伤即刻、30 min、1、3、7、14、21、28 d共8个时相点，每个时相点各取2只大鼠，正常对照组取2只大鼠行台盼蓝－茜素红联合活细胞染色检测角膜内皮细胞。另Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组按烧伤即刻及烧伤后1、3、7、14、21、28 d各取2只大鼠，正常对照组取2只大鼠行HE染色。

1.2 裂隙灯显微镜观察

于造模后即刻、30 min、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 组织病理学观察

于造模后各时间点，各组抽取2只大鼠，角膜切片HE染色，光镜下观察角膜损伤程度和白细胞浸润[1]。

1.4 角膜内皮台盼蓝－茜素红活细胞联合染色

按分组每个时相点抽取2只大鼠，麻醉后行裂隙灯显微镜检查，然后摘除眼球，置于4 ℃ PBS(0.1 mol/L，pH 7.4)浸湿的纱布上，解剖显微镜下沿角膜缘全周剪下角膜，注意勿损伤内皮面。将内皮面朝上置于蜡板上，用剃须刀将角膜切成4块(中央相连，勿游离)，然后将角膜移至载玻片上，滤纸轻触吸干内皮面多余的水分。0.25%台盼蓝溶液滴于角膜片的内皮面上，保留1.5 min，生理盐水冲洗，滤纸轻触吸干内皮面多余的水分；接着用0.2%茜素红溶液滴于角膜片的内皮面上，保留2 min，生理盐水冲洗，滤纸轻触吸干内皮面多余的水分；2.5%中性戊二醛溶液滴于角膜片的内皮面上，保留30 min，滤纸轻触吸干内皮面多余的水分，中性树脂封片，光镜下观察(×40，×400)并拍照。

1.5 内皮细胞愈合率计算

将低倍(×40)光镜下采集的角膜内皮细胞照片输入计算机，采用Image-Pro Plus 4.5图像处理软件标出角膜损伤即刻内皮细胞蓝染区域，测量该区域的面积即为烧伤即刻角膜内皮损伤面积，同法测定不同时相点角膜内皮缺损面积，按下面公式计算内皮细胞愈合率：

内皮细胞愈合率(%)=(烧伤即刻角膜内皮损伤面积－观察时角膜内皮缺损面积)/烧伤即刻角膜内皮损伤面积×100%

1.4 白细胞数计算

采用Image-Pro Plus 4.5图像处理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4只眼球，求其平均值。

1.5 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析、均数间的多重比较和偏相关分析。

2 结果

2.1 裂隙灯显微镜观察结果

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组酸烧伤造模后即刻及各时相点角膜裂隙灯显微镜观察的结果同我们的前期研究[1]。各组角膜上皮愈合情况见表1。

表1 角膜酸烧伤后上皮缺损直径(l/mm)

组别	n	时间(t/d)					
		1	3	7	14	21	28
Ⅰ	4	2.7±0.3	0	0	0	0	0
Ⅱ	4	3.4±0.2[a]	1.9±0.1[a]	0	0	0	0
Ⅲ	4	4.2±0.3[bc]	3.3±0.3[bc]	2.6±0.2[bc]	0.9±0.1[bc]	0	0

F=32.627，a：P<0.05，b：P<0.01，与Ⅰ组比较；c：P<0.01，与Ⅱ组比较

2.2 角膜内皮的光镜观察结果

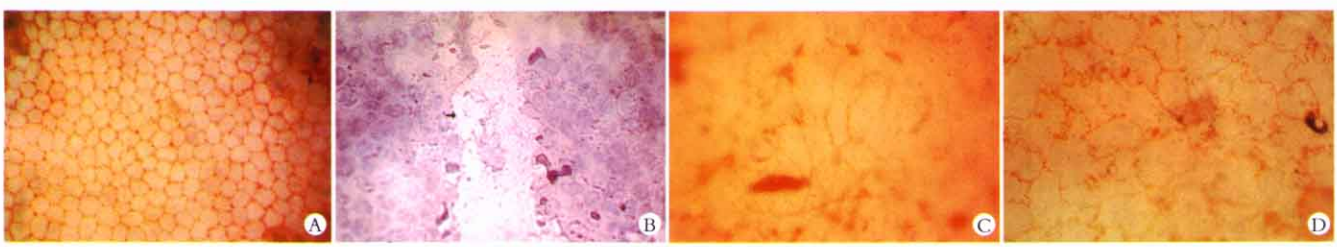
正常角膜内皮细胞为边界清晰呈橘红色的六角形细胞，大小均匀一致，交错排列，核未能见(图1A)。酸烧伤后各时相点，轻、中度烧伤组内皮细胞均未见任何变化。重度酸烧伤即刻，整个损伤区内皮面均为蓝染的细胞核，且核肿胀、模糊，茜素红不着色，周边未损伤区内皮细胞亦不着色；30 min，内皮面细胞皱缩，大片脱落(图1B)；第1天，内皮细胞无法看见，周边内皮细胞仍不着色；第3天，损伤区周边见部分内皮细胞变形，呈梭形或不规则形，细胞变长、增大，向损伤区内移行(图1C)；第7天，损伤区周边较大范围均可见内皮细胞，呈梭形及各种不规则形，细胞增大明显(图1D)；第14天，中央大部分也出现了内皮细胞，细胞增大、变形明显；第21天，整个损伤区内皮面均已覆盖内皮细胞，细胞变形，大小不一；第28天，中央部分内皮细胞排列紧密，变小，但仍比正常细胞大，部分细胞已出现六角形形状，但大部分细胞仍增大、变形明显。内皮细胞愈合率见图2。

2.3 HE染色

HE染色显示轻、中、重度酸烧伤即刻角膜上皮细胞核均呈淡灰色(正常呈深蓝色)。轻度酸烧伤基质未见异常；中度酸烧伤损伤达较深基质层，基质胶原凝固，纹理不清；重度酸烧伤基质全层凝固变薄，胶原纹理不清。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组烧伤后各时相点角膜白细胞数比较与我们前期研究相同[1]。

2.4 内皮细胞与角膜上皮和白细胞浸润的关系

将内皮细胞愈合率与角膜上皮缺损直径和白细胞数量进行偏相关分析，结果为内皮细胞愈合率与角膜上皮缺损直径呈显著负相关(r=－0.504 8，P<0.01)，内皮细胞愈合率与白细胞数呈显著负相关(r=－0.529 6，P<0.01)。



A：正常内皮细胞；B：重度酸烧伤30 min；C：重度酸烧伤第3天；D：重度酸烧伤第7天

图1 角膜内皮细胞光镜观察 (台盼蓝-茜素红联合染色×400)

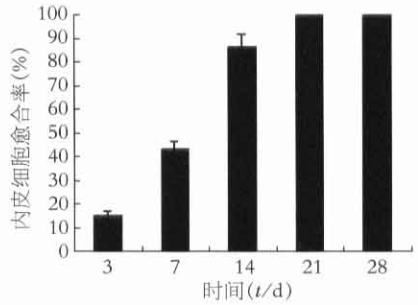


图 2　重度酸烧伤后角膜内皮细胞愈合率

3　讨论

酸性物质溶于水而不溶于脂，与眼组织接触时，可使蛋白质凝固、变性，造成眼表基质腐蚀性损伤，并形成不溶于水的凝固蛋白化合物，阻止了酸性物质进一步向深层渗透。但致伤物若超过一定的强度和作用时间也会造成严重的破坏作用[2]。本实验中，造模即刻 HE 染色检查显示，轻、中度酸烧伤角膜破坏的深度在上皮及较深基质层，烧伤后各时相点台盼蓝 - 茜素红联合染色内皮细胞均无损伤改变，可见在烧灼停止后酸性物质未继续向内扩散；在延长烧灼时间后，角膜全层结构呈凝固性坏死，台盼蓝 - 茜素红联合染色显示损伤区内皮细胞在烧伤即刻即出现破损（核蓝染），并很快坏死、脱落，提示内皮细胞的即刻损伤为酸性物质的直接损害所致。不同酸性物质造成组织损害途径不同，本研究中采用硫酸可能通过以下几种途径造成深层内皮细胞损害：①酸的蛋白损害作用：酸性物质作用于内皮细胞膜，使膜蛋白凝固从而造成内皮细胞的损害[2]。②热损伤：当硫酸与组织反应时，在局部产生较多热量，温度升高，可造成内皮细胞的热损伤[3]。③酸应激（acid stress）性损伤：尽管酸与组织蛋白反应所形成的凝固物有一定的屏障作用，当酸性物质持续存在时，氢离子仍可通过屏障继续扩散，造成内皮细胞局部 pH 值降低，导致内皮细胞酸应激性损伤。④内皮细胞所依赖的基质环境破坏：酸性物质造成后弹力层蛋白凝固，破坏了内皮细胞所黏附的基质环境，导致内皮细胞与基质层分离而脱落。

化学烧伤除直接造成角膜内皮损害外，还可通过间接途径造成角膜内皮损伤。Chung 等[4,5]在研究兔角膜碱烧伤时发现角膜炎症和房水成分改变可造成内皮细胞的继发性损害，应用地塞米松抑制炎症反应后角膜内皮愈合加快。我们的前期研究及本实验表明轻、中度酸烧伤后角膜有少量炎症细胞浸润，中度烧伤房水也有微量白细胞浸润，但内皮细胞均无损伤改变；重度酸烧伤后角膜及房水有大量炎症细胞浸润，炎症减轻时角膜内皮细胞修复加快[1]，统计分析显示角膜炎症细胞浸润与内皮细胞的愈合成负相关，说明继发性炎症反应严重时也可参与酸烧伤后角膜内皮细胞的损害，影响角膜内皮细胞修复。

角膜内皮细胞通过屏障功能和主动液泵来维持角膜的正常厚度和透明性。如果内皮细胞受到炎症、创伤、毒素等影响导致坏死、脱落超过其代偿限度时，角膜即出现水肿改变。过多的水分在角膜基质层中堆积，可破坏胶原纤维的有序结构，使光线散射，角膜混浊。基质的水肿产生不利于角膜上皮愈合的局部微环境，导致角膜溃疡迁延不愈[4]。谢立信等[6]研究发现，内皮细胞的损伤可导致角膜水肿，内皮细胞丢失越多，角膜水肿越重，二者具有对应关系，故可根据水肿程度对内皮细胞的损失量进行评估。我们的实验显示：尽管造模时酸烧伤引起角膜损伤面积相同，但是轻、中度酸烧伤内皮细胞完好，角膜水肿很快消退，上皮愈合也快，而重度酸烧伤损伤区内皮细胞全部坏死、脱落，从而导致房水进入基质层，使角膜水肿，后者影响角膜上皮的愈合，出现角膜溃疡迁延不愈；当内皮细胞愈合后，角膜水肿很快消退，溃疡也快速愈合，统计分析显示，内皮细胞的愈合与上皮缺损成负相关。由此可见，重度角膜酸烧伤时内皮细胞受损是角膜基质及上皮愈合的一个不利因素。

本研究提示，在治疗重度角膜酸烧伤时除强调早期去除致病原因外，还应注意采取一些积极措施，一方面保护内皮细胞免受继发性损害，使尚未坏死的内皮细胞尽快恢复其结构和功能；另一方面促进内皮细胞迁移，恢复内皮细胞的屏障作用，最终为角膜损伤的修复创造有利条件[5,7]。

参考文献：

[1] 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.

[2] 何守志. 临床眼科学[M]. 天津：天津科学技术出版社，2002：909 - 911.

[3] REIM M，REDBRAKE C，SCHRAGE N. Chemical and thermal injuries of the eyes. Surgical and medical treatment based on clinical and pathophysiological findings[J]. Arch Soc Esp Oftalmol，2001，76(2)：79 - 124.

[4] CHUNG J H，FAGERHOLM P. Endothelial healing in rabbit corneal alkali wounds[J]. Acta Ophthalmol (Copenh)，1987，65(6)：648 - 656.

[5] CHUNG J H，PACK S M，CHOI J J，*et al*. Effect of topically applied 0.1% dexamethasone on endothelial healing and aqueous composition during the repair process of rabbit corneal alkali wounds[J]. Curr Eye Res，1999，18(2)：110 - 116.

[6] 谢立信，姚　瞻，黄钰森，等. 超声乳化白内障吸除术后角膜内皮细胞损伤和修复的研究[J]. 中华眼科杂志，2004，40(2)：90 - 93.

[7] PETROLL W M，JESTER J V，BARRY_LANE P A，*et al*. Effects of basic FGF and TGF beta 1 on F-actin and ZO-1 organization during cat endothelial wound healing[J]. Cornea，1996，15(5)：525 - 532.

（编辑　王　红）