论著

文章编号:1000-5404(2008)08-0728-04

重组人角质细胞生长因子异构体抑制兔角膜基质细胞增殖分化的研究

李 薇,周远大 (重庆医科大学附属第一医院临床药理研究室,重庆 400016)

摘 要:目的 观察重组人角质细胞生长因子异构体(recombinant human keratinocyte growth factor variant, K102)对实验性兔角膜损伤的治疗作用。**方法** 108只家兔均在显微镜下造成板层切割损伤模型,并分成K102药物大剂量(0.5 mg/ml)、中剂量(0.25 mg/ml)、小剂量(0.125 mg/ml)治疗组、贝复舒对照组(贝复舒滴眼液治疗,2 400 AU/ml)、地塞米松对照组(地塞米松磷酸钠滴眼液治疗,0.25 mg/ml)和空白组(K102滴眼液的溶媒滴眼治疗)。通过裂隙灯观察角膜上皮下雾状浑浊(Haze)差别。于术后30、90 d处死动物取角膜行光镜及电镜检查。**结果** 术后30、90 d, K102药物治疗的各组Haze评分及前50 μm角膜基质层内平均角膜细胞数均明显低于阳性对照组及空白组($P<0.05$),光镜及电镜检查结果显示K102大剂量组角膜成纤维细胞活化及增殖程度明显轻于贝复舒对照组、空白组。**结论** K102滴眼液可抑制角膜损伤后的角膜基质细胞过度增殖、活化,减少早期Haze形成。

关键词: 角质细胞生长因子;角膜;显微角膜板层切割术;角膜上皮下雾状浑浊

中图法分类号: R329.28;R772.205;R988.1 **文献标识码:** A

Recombinant human keratinocyte growth factor variant for mechanical corneal injury in rabbits

LI Wei, ZHOU Yuan-da (Laboratory of Clinical Pharmacology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of recombinant human keratinocyte growth factor variant (K102) on mechanical corneal injury in rabbits. Methods Mechanical corneal injury was made in 108 rabbits surgically. K102 eye drop was given respectively at dose of 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml, taking Beifushu eye drops and Dexamethasone sodium phosphate eye drops as the positive control, and K102 eye drop solvent as the blank control; 4 times per day. Corneal haze was determined with slit lamp microscope and the histopathological changes were observed under light and electron microscope. Results Three months after operation, the corneal haze was less severe and the average number of corneal cells in shallow 50 μm corneal basement was less than that in Beifushu group and blank group after 0.5 mg/ml K102 treatment. The results of light and electron microscopy showed the epithelial hypertrophy, disorders of cells and collagen arrangement after 0.5 mg/ml K102 treatment were much lighter than that in Beifushu group and blank group. Conclusion Local application of K102 eye drops reduces the number of stromal keratocyte, then effectively inhibits corneal haze at early stage after mechanical corneal injury in rabbits.

Key words: keratinocyte growth factor; cornea; microlamellar keratectomy; haze

角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)是从肺成纤维细胞分离得到,它属于成纤维细胞生长因子(FGF)家族中的第7个成员,能够介导多种组织表(上)皮细胞增殖和分化[1]。随着研究深入,Emoto等[2]从人肺中克隆到一种新的生长因子(keratinocyte growth factor-2, KGF-2),特异性受体为酪氨酸激酶受体FGFR2ⅢⅠb(KGFR)和FGFR。KGF-2能促进角质上皮细胞的增殖,刺激损伤组织周围上皮细胞的再生、分化和迁移,而对成纤维细胞和内皮细胞则无直接作用,可以减轻伤口愈合后的疤痕[3]。本课题组通过对KGF-2的氨基酸序列突变,研制出新的变构体K102(专利号:03101156)[4],用于治疗肝纤维化,取得较好结果[5,6]。本研究选用兔角膜板层切割损伤为动

基金项目:重庆市渝中区科技计划项目(2007)
Supported by the 2007 Scientific Projects of Yuzhong District of Chongqing (2007)

作者简介:李 薇,女,四川省自贡市人,硕士研究生,主要从事临床药理方面的研究。电话:13212353027, E-mail:weiwei19831156@163.com

通信作者:周远大,电话:(023)89012346,E-mail: zydchq@sohu.com

收稿日期:2007-09-19;修回日期:2007-10-31

物模型,观察 K102 滴眼液在角膜损伤后能否减轻组织修复时瘢痕产生,并与市售贝复舒及地塞米松比较。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

健康家兔 108 只,雌雄兼用,兔龄约 4 个月,体质量 2.0 ~ 2.5 kg。购自重庆医科大学实验动物中心,合格证号:SKC(渝 20020001),均无眼部疾患。贝复舒滴眼液由珠海亿胜生物制药有限公司生产,批号为:20060603。2% 医用丁卡因滴眼液由本院提供,批号为:20060917。左氧氟沙星滴眼液由朗悦制药有限公司提供,批号:060409。地塞米松磷酸钠滴眼液:芜湖三益制药有限公司。批号:060201。S350-ST 裂隙灯:上海美沃公司。YZ20T-Ⅱ眼科显微镜:苏州医疗机械厂。

1.2　K102 滴眼液的配制

K102 由重庆富进生物医药有限公司提供(批号:060808,无色透明液体,浓度 2 mg/ml)。取适量 K102 配制成 0.5、0.25、0.125 mg/ml 3 个浓度的滴眼液,调 pH 为 7.3,渗透压为 296 mOsmol/kg,微孔滤膜过滤除菌,备用。ELISA 方法鉴定滴眼液中 K102 的生物活性。

1.3　角膜板层切割动物模型的建立

家兔均采用 3% 戊巴比妥钠 0.8 mg/kg 静脉注射麻醉。用 0.2% 左氧氟沙星滴眼液冲洗结膜囊,0.2% 丁卡因滴眼液表面麻醉 2 次,缝线开眼,暴露角膜,用棉签拭去眼表水分,在手术显微镜下以角膜为中心,直径 7.5 mm 的环钻行压迹划痕,用剃须刀片剥除上皮及其部分角膜基质层(厚达 150 μm),切割面平滑,立即以 0.2% 左氧氟沙星滴眼液冲洗眼表面,防止感染。手术模型均为同一人操作完成。

1.4　各组用药

将角膜板层切割模型成功动物 108 只分为 6 组:K102 药物按药物体外浓度筛选实验结果分为大剂量(0.5 mg/ml)、中剂量(0.25 mg/ml)、小剂量(0.125 mg/ml)治疗组、贝复舒对照组(贝复舒滴眼液治疗,2 400 AU/ml)、地塞米松对照组(地塞米松磷酸钠滴眼液治疗,0.25 mg/ml)和空白组(K102 滴眼液的溶媒滴眼治疗)组,共 6 组,每组 18 只。首次给药各组以其相应治疗药物 30 μl 滴于滤纸(直径 7.5 mm)上,贴附于角膜切削区 5 min 后移去,之后每只眼滴眼液频率为:每天 4 次,每次 2 滴,直至实验结束处死动物。各实验组在术后治疗间隙均给予 0.2% 左氧氟沙星液滴眼每日 3 次,防止感染,至 4 d 后上皮完整覆盖眼表。

1.5　在体观察

术后每天用裂隙灯显微镜检查眼前段大体情况并进行记录,重点观察畏光、眼睑肿胀程度、分泌物、虹膜充血、角膜溃疡、角膜透明度。按文献[7]记录 Haze 评分,角膜透明为 0 级;裂隙灯显微镜斜照法很难发现点状混浊为 0.5 级;裂隙灯显微镜斜照法发现点状混浊为 1 级;裂隙灯较易发现混浊,但不影响虹膜纹理观察为 2 级;角膜混浊较重,影响虹膜纹理观察为 3 级;混浊严重,虹膜纹理模糊不清为 4 级。

1.6　组织学检查

10、30、90 d 各组在观察照相后,分别处死 6 只动物,完整剪下角膜,均匀分成两半,其中一半经 10% 甲醛固定,常规脱水包埋,切片,HE 染色,光镜观察;另一半戊二醛固定后置于电镜下观察。

1.7　图像分析

Image-pro-plus 图像分析系统对 HE 染色标本进行前 50 μm 角膜基质内平均角膜细胞计数。基质内成纤维细胞数的计算:深度从基底膜开始 50 μm 深,取切削区中央 50 μm 及临近 1.5 mm 外 2 个 50 μm 宽度内成纤维细胞数,平均数即为 5 000 μm^2的成纤维细胞数。

1.8　统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析。

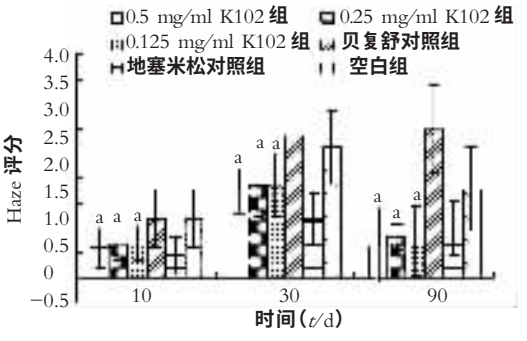
2　结果

2.1　在体观察

术后每天用裂隙灯显微镜检查眼前段大体情况,均无畏光、流泪,上皮脱落等刺激反应。

2.2　角膜 Haze 的观察评分

术后各时间点,K102 药物各治疗组及地塞米松对照组 Haze 评分较空白组轻,其评分与空白组比较差异有显著性意义($P<0.05$),见图 1。



a:$P<0.05$,与空白组比较

图 1　各组兔角膜板层切割后不同时间点上皮下浑浊(Haze)评分

2.3　光镜观察结果

术后 30 d,K102 药物大剂量及中小剂量组动物角膜板层切削区再生上皮稍厚,基底细胞轻度水肿,体积增大,基质浅层成纤维细胞稍有增殖,其中大剂量组更佳。贝复舒对照组动物角膜板层切削区再生上皮细胞增厚,上皮及基底细胞水肿,可见空泡样变性,上皮细胞连接疏松,基质浅层成纤维细胞稍增殖明显,形态及排列不规则。空白组动物角膜板层切削区上皮层厚薄不均、明显增生(12 ~ 13 层细胞),前基质层成纤维细胞增殖明显,胶原排列紊乱疏松。

术后 90 d,K102 药物大剂量(图 2A)及中小剂量组动物角膜板层切削区上皮持续增厚,基底膜、基质浅层成纤维细胞数

量的增多不甚明显,其中仍以大剂量组更佳。贝复舒对照组(图2B)动物角膜板层切削区上皮持续增厚且明显大于K102药物大剂量组,上皮细胞形态不规则基底细胞未恢复高柱状,基质浅层仍有大量成纤维细胞分布。空白组(图2C)动物角膜板层切削区上皮层厚薄不均,在切削区可见明显增生,上皮细胞形态不规则基底细胞未恢复高柱状,浅层基质胶原纤维排列疏松但成纤维细胞数量开始减少。

2.4 角膜浅基质层角膜细胞数目的改变

板层切割术后不同时间角膜基质层前50 μm内,角膜细胞数见表1。正常对照组前50 μm角膜基质内细胞数为(22.50±2.17)个。

表1 角膜板层切除后不同时间点前50 μm角膜基质层内角膜细胞数($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	1个月	3个月
空白组	37.33±1.21	35.67±1.97
贝复舒对照组	41.83±2.32	37.33±1.21
地塞米松对照组	27.83±2.04	23.33±3.07
K102大剂量组	32.17±2.79[b]	29.17±1.47[b]
K102中剂量组	34.67±2.42[a]	29.67±2.50[b]
K102小剂量组	34.17±1.47[b]	29.50±3.08[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与贝复舒对照组比较

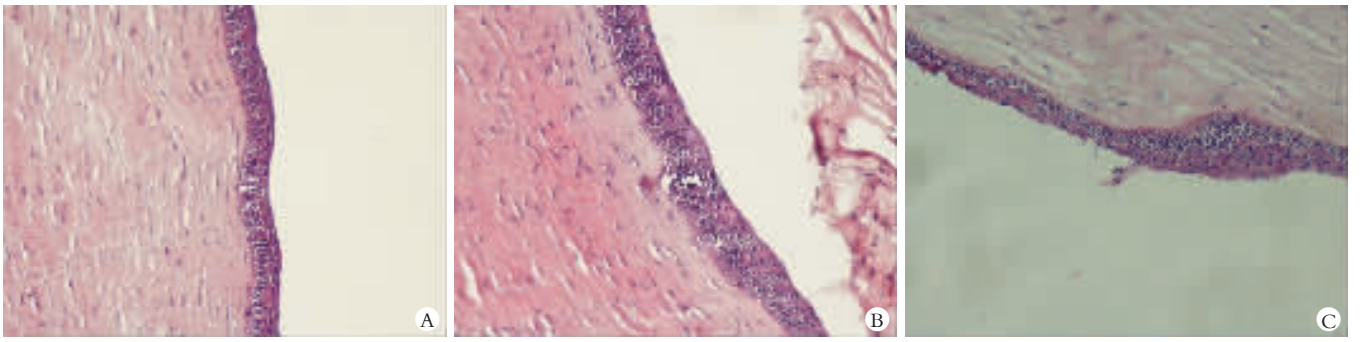
2.5 电镜观察

板层切割术后30 d,K102大剂量组(图3A)电镜观察可见:上皮基底细胞增大,分裂像增多,上皮细胞内可见功能活跃的细胞器存在,半桥粒连接均匀、完整。前基质可见略有增殖的成纤维细胞。细胞肥大、细胞质丰富,细胞质内空泡形成。扩张的粗面内质网增多,线粒体肿胀,高尔基体发达,细胞周围可见新合成的胶原纤维,较细、排列紧密,呈一定的极向顺序排列。K102中、小剂量组电镜观察与K102大剂量组相似。贝复舒对照组(图3B)电镜观察可见:上皮基底细胞异常增大,分裂像增多,上皮细胞内大量扩张的粗面内质网、明显肿胀的线粒体及呈网状分布的微丝;无半桥粒连接。前基质可见大量成纤维细胞。细胞肥大、细胞质丰富,细胞质内空泡形成。扩张的粗面内质网增多明显,线粒体肿胀,高尔基体发达,且含有丰富的微管、微丝,染色质着边,细胞周围可见新合成的胶原纤维。较细、疏松,排列紊乱,失去了板层结构,瘢痕形成。空白组(图3C)电镜观察可见:上皮细胞形态与K102大剂量组类似,但未形成完整的半桥粒连接,前基质可见大量活跃的成纤维细胞,新分泌的细小胶原纤维散乱分布在细胞周围。

板层切割术后90 d,K102大剂量组(图3D)电镜观察:上皮基底细胞恢复正常大小,排列整齐,半桥粒连接均匀,完整。前基质成纤维细胞,形态恢复正常,已转为功能不活跃的细胞。细胞周围胶原粗细仍不均匀、排列紧密,呈一定的极向顺序排列。贝复舒对照组(图3E)电镜观察:上皮基底细胞恢复正常大小,但排列不齐,未形成半桥粒连接。前基质成纤维细胞,大部分形态恢复正常,但仍可见增生较活跃的成纤维细胞,胞浆内仍见较多肿胀的线粒体及扩张的粗面内质网,细胞周围可见新合成的胶原纤维。细胞周围胶原粗细仍不均匀、排列紧密,呈一定的极向顺序排列。空白组电镜观察(图3F):上皮基底细胞恢复正常大小,排列整齐,半桥粒连接均匀,完整。前基质成纤维细胞,大部分形态恢复正常,但仍可见增生较活跃的成纤维细胞,细胞质内仍见较多肿胀的线粒体及扩张的粗面内质网,细胞周围可见新合成的胶原纤维。细胞周围胶原粗细仍不均匀、排列紧密,呈一定的极向顺序排列。

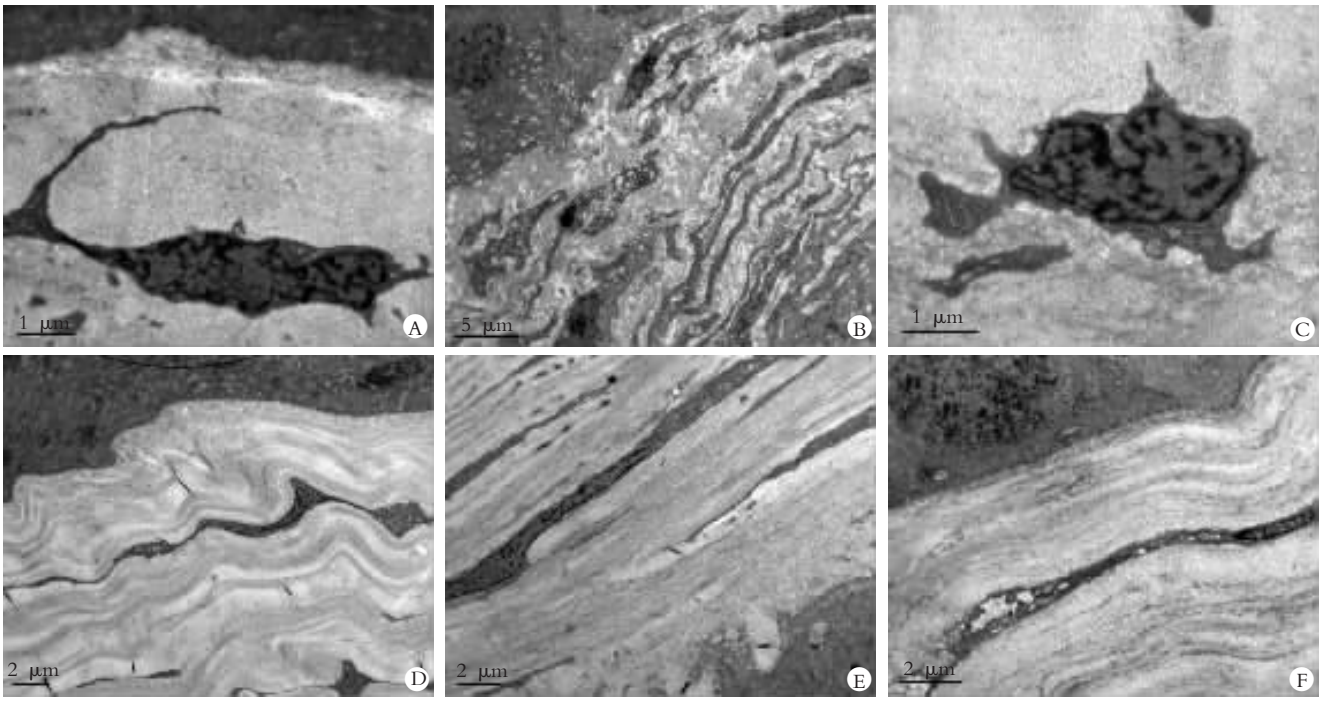
3 讨论

由于机械伤、手术及其他原因引起的角膜外伤是一种常见的眼表疾病,如果损伤深达角膜基质层,在损伤修复时期,前基质成纤维细胞数量增加、功能活跃,生成大量胶原填充缺损,新的胶原纤维排列不规则;而基质细胞的表达又可使一些细胞因子通过胞外基质间特殊因子的作用,刺激上皮过度增殖,表现为上皮细胞体积增大、细胞层数增多等,在临床上也留下不同程度的瘢痕。这些瘢痕组织的形成也就是角膜纤维化,严重影响视力。目前治疗角膜机械伤或进行角膜屈光手术后,常规使用糖皮质激素以预防角膜纤维化,但高浓度长时间的应用糖皮质激素对眼部毒副作用较多,甚至造成视功能的永久性丧失。



A:K102大剂量组; B:贝复舒对照组; C:空白组

图2 各组术后90 d兔角膜组织学观察 (HE×200)



A: K102 大剂量组术后 30 d; B:贝复舒对照组术后30 d; C:空白组术后 30 d; D:K102 大剂量组术后 90 d; E:贝复舒对照组术后 90 d; F:空白组术后 90 d

图 3　各组术后兔角膜组织电镜观察结果

有研究表明[8],将外源性 KGF-2 用于实验性兔角膜 PRK 术后治疗,KGF-2 减缓上皮愈合,抑制上皮细胞过度增生,有助于减轻 Haze 发生。因此本课题组在前期的研究中选择 KGF-2,通过对其氨基酸序列突变,研制出 KGF-2 变异体 K102,不改变其对于上皮细胞的作用而使其具有抑制成纤维细胞生长的作用,降低胶原合成,并在治疗肝纤维化的实验中取得较好的疗效[5,6]。

本实验将不同浓度的 K102 滴眼液用于兔角膜板层切割的机械伤模型。结果表明,不同浓度的 K102 滴眼液可抑制上皮细胞的过度增殖,但其再覆盖速率并未有明显减慢;通过病理检查可见 K102 各剂量组的上皮细胞的形态恢复较好,细胞层数正常,1 个月时已能形成完整均匀的基底膜,而空白组上皮细胞体积增大、细胞层数增多、细胞排列混乱。术后各时间点,经 K102 药物治疗的大、中、小剂量组 Haze 评分均小于空白组($P<0.05$),并未见明显毒副作用,但前期抗纤维化作用均不如地塞米松对照组。这可能是由于药物浓度过低或活性不足造成,还需更深入的研究。若此药若经进一步的临床研究证实能安全应用于临床,可大大减轻患者的经济负担,也免除了术后长期滴用皮质类固醇等药物所带来的种种弊病。

参考文献:

[1] von-Bultzingslowen I, Brennan M T, Spijkervet F K, *et al*. Growth factors and cytokines in the prevention and treatment of oral and gastrointestinal mucositis[J]. Support Care Cancer, 2006, 14(6): 519 – 527.

[2] Emoto H, Tagashira S, Mattei M G, *et al*. Structure and expression of human fibroblast growth facter 10[J]. J Biol Chem, 1997, 272(37): 23191 – 23194.

[3] 陈　琦, 马　端. 新型抗溃疡及促进伤口愈合药——重组人角质细胞生长因子 2 [J]. 中国新药杂志, 2003, 12(6): 419 – 422.

[4] 重庆富进生物医药有限公司. 新型人角质细胞生长因子突变体: 中国, 03101156. X[P]. 2003 – 01 – 13.

[5] 范　开, 黄洪涛, 张大志. 重组新型人角质细胞生长因子异构体抗肝纤维化实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(3): 229 – 230.

[6] 霍黉琦, 李新平, 范　开, 等. 重组人角质细胞生长因子的体内外作用研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(20): 1749 – 1752.

[7] Tani E, Katakami C, Negi A. Effects of various eye drops on corneal wound healing after superficial keratectomy in rabbits[J]. Jpn J Ophthalmol, 2002, 46(5): 488 – 495.

[8] Rajan M S, Shafiei S, Mohrenfels C V, *et al*. Effect of exogenous keratinocyte growth factor on corneal epithelial migration after photorefractive keratectomy[J]. J Cataract Refract Surg, 2004, 30(10): 2200 – 2206.

(编辑　汪勤俭)