

TNF- α 和 PDGF 在保存羊膜移植治疗兔角膜急性碱烧伤中的作用

赵琳¹, 王峰¹, 石蕊², 熊全臣¹

基金项目: 中国陕西省科技发展基金资助项目 (No. 2003K10-G29)

作者单位:¹(710004) 中国陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院眼科;²(710068) 中国陕西省西安市, 陕西省人民医院眼科

作者简介: 赵琳, 女, 硕士, 住院医师, 研究方向: 角膜病。

通讯作者: 王峰, 男, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 角膜病. wangfeng_xa@163. com

收稿日期: 2010-03-04 修回日期: 2010-06-11

Effect of TNF- α and PDGF in preserved amniotic membrane transplantation at early stage of acute corneal alkali burn in rabbits

Lin Zhao¹, Feng Wang¹, Rui Shi², Quan-Chen Xiong¹

Foundation item: Shaanxi Province Science and Technology Development Foundation, China (No. 2003K10-G29)

¹Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of the Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Feng Wang. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of the Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. wangfeng_xa@163. com

Received: 2010-03-04 Accepted: 2010-06-11

Abstract

• **AIM:** To observe the effect of tumor necrosis factor α (TNF- α) and platelet derived growth factor (PDGF) in preserved amniotic membrane transplantation (AMT) during early corneal alkali burns in rabbits.

• **METHODS:** Twelve rabbits were used to establish corneal alkali burn models with 1mmol/L sodium hydroxide and the AMT was performed within 24 hours in the right eyes, and the left eyes were as control. The morphologic change of eyes was observed regularly and the TNF- α concentration of aqueous humor was measured by enzyme linked immunosorbent assay method 7, 14, 21, 28 days after AMT procedure. Also, PDGF-BB (a maker of PDGF) protein expression of corneal tissue was observed by immunohistochemistry method.

• **RESULTS:** Compared to the control group, the AMT eyes showed moderate corneal inflammation, distinctive ulcer boundary, quick epithelium regeneration and shorter corneal neovascularization length. The TNF- α concentration in the 7th and 28th day in ATM group was 315.5 \pm 19.8 ng/L and 140.6 \pm 11.5 ng/L respectively,

which was significantly lower than those in control group with 363.0 \pm 28.5 ng/L and 283.5 \pm 19.9 ng/L ($P < 0.05$). The PDGF-BB protein expression increased 14 and 28 days after ATM procedure than those in control group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The preserved AMT is effective in ocular reconstruction in early stage of corneal alkali burns, which may resulted from the inhibition of TNF- α concentration and the increase of PDGF expression.

• **KEYWORDS:** alkali burn; amniotic membrane transplantation; platelet derived growth factor; tumor necrosis factor α

Zhao L, Wang F, Shi R, et al. Effect of TNF- α and PDGF in preserved amniotic membrane transplantation at early stage of acute corneal alkali burn in rabbits. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(7):1263-1265

摘要

目的: 观察保存羊膜移植治疗兔角膜急性碱烧伤眼的组织学变化并探讨肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 的作用。

方法: 建立兔急性角膜碱烧伤模型, 并于 24 h 内行保存羊膜移植术 (右眼, 12 眼/组), 设左眼为对照组。术后观察双眼形态及角膜新生血管变化, 并检测房水中 TNF- α 含量及角膜组织 PDGF-BB 的表达情况。

结果: 与对照组比较, 治疗组炎症反应轻, 角膜溃疡范围小, 上皮再生速度快, 新生血管长度短 ($P < 0.05$)。7, 28d 治疗组房水 TNF- α 含量分别为 315.5 \pm 19.8 ng/L 和 140.6 \pm 11.5 ng/L, 明显低于对照眼的 363.0 \pm 28.5 ng/L 和 283.5 \pm 19.9 ng/L ($P < 0.05$)。与对照组比较, 治疗组 PDGF 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。

结论: 角膜急性碱烧伤后早期行保存羊膜移植术, 能抑制眼内炎症, 促进角膜修复, 其作用与抑制 TNF- α , 促进 PDGF 表达有关。

关键词: 碱烧伤; 羊膜移植术; 血小板源性生长因子; 肿瘤坏死因子- α

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.07.008

赵琳, 王峰, 石蕊, 等. TNF- α 和 PDGF 在保存羊膜移植治疗兔角膜急性碱烧伤中的作用. 国际眼科杂志 2010;10(7):1263-1265

0 引言

近年来, 羊膜移植已经广泛用于治疗眼表疾病, 但新鲜羊膜移植和保存羊膜移植疗效优劣仍有争论。在前期的研究基础上^[1,3], 我们建立兔角膜急性碱烧伤模型并行保存羊膜移植, 并探讨肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和血小板源性生长因子 (platelet derived

growth factor, PDGF)在羊膜移植眼表重建中的作用如下。

1 材料和方法

1.1 材料 健康新西兰白兔 12 只 24 眼,雌雄不限,实验前用显微镜、裂隙灯等观察无眼前节病变,每只兔行双眼碱烧伤后,选择左眼为对照眼,右眼为治疗眼(12 眼/组)。所用羊膜均取自健康剖宫产妇的胎盘,且排除 HIV, HBV, HCV, 梅毒及其他传染病。产后立即无菌条件下取出胎盘,清除血凝块,钝性分离获取羊膜。将处理干净的羊膜修剪成 3cm × 3cm 大小,置于体积比为 1:1 的甘油:DMEM 培养液中, -80℃ 保存,保存期 2mo。

1.2 方法 盐酸丙美卡因表面麻醉,置开睑器,充分暴露眼表,以浸有 1mmol/L NaOH 溶液、直径 6mm 的单层圆形滤纸片置于兔角膜表面中央,70s 后取下,立即用 40mL 生理盐水连续冲洗眼角膜表面 2min。角膜碱烧伤后 24h 内行移植手术,步骤如下:氯胺酮 50mg/kg 和异丙嗪 25mg/kg 等量混合共 4mL 背部皮下注射全身麻醉。铺孔巾,开睑器打开右眼。刮除角膜表面坏死组织,沿角膜缘 360° 环形剪开球结膜,暴露前部巩膜床 3mm。将备好的羊膜上皮面向上平铺于角膜表面,边缘超出角膜缘 3mm,10-0 无损伤线间断缝合羊膜与球结膜,并固定于角膜缘外 2mm 处浅层巩膜,使羊膜紧贴于角膜创面,剪去多余羊膜。结膜囊内涂红霉素眼膏,术后每日双眼滴氯霉素滴眼液 2 次,7d 拆除右眼睑缝线。对照眼仅剪开球结膜,暴露前部巩膜床 3mm,余同治疗眼。术后 1, 7, 14, 21 和 28d, 每组随机对 6 只兔眼从角膜缘穿刺抽取 0.1mL 房水,用来测定房水中 TNF-α 含量。术后 14 和 28d,用空气栓塞法处死实验兔,取治疗眼及对照眼角膜组织,40g/L 甲醛固定,石蜡包埋,行 HE 染色及免疫组化 PDGF-BB 蛋白表达检测。观察:(1)除观察术眼是否感染,羊膜是否在位,新生血管发生情况外,术后 7,14,21,28d 用裂隙显微镜观察并测量角膜上方 12:00 处新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 长度,荧光素钠法观察角膜上皮缺损情况。(2)TNF-α 测定:采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法,以自动酶标仪 492nm 处测吸光值,并根据标准曲线计算房水 TNF-α 含量(兔 TNF-α 定量 ELISA 试剂盒购自上海森雄公司)。(3)PDGF-BB 蛋白表达检测:采用免疫组化-SP 法检测角膜组织中 PDGF 表达,步骤如下:石蜡切片厚 4μm,脱蜡水化,30mL/L 过氧化氢孵育 20min,100mL/L 正常山羊血清孵育 5min,加入 PDGF-BB 一抗(1:70,北京中杉),4℃ 过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃ 孵育 30min, DAB 显色,自来水洗终止,复染,封片。PDGF-BB 蛋白阳性表达为胞膜和胞质阳性。染色淡黄色为弱阳性(+),棕黄阳性(++),深棕为强阳性(+++),见图 1。

统计学分析:用 SPSS 13.0 统计软件包处理数据资料。计量资料均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析及 *t* 检验,等级资料采用秩和检验比较, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 角膜改变 所有眼碱烧伤模型全部成功建立,烧伤 24h 后可见角膜中央区出现与滤纸片相同直径、边界清晰的圆形灰白色混浊。烧伤后 7d,对照眼结膜充血水肿明显,炎性反应加重,分泌物多。角膜基质弥漫水肿、增厚,角膜混浊区域面积增大、边界模糊、表面粗糙,部分眼角膜中央出现较深溃疡。此后,结膜及角膜基质水肿逐渐减退,溃疡面积及深度逐渐减小。至 28d,结膜及角膜基质仅有轻度充血水肿,角膜中央溃疡已修复,并最终发展为

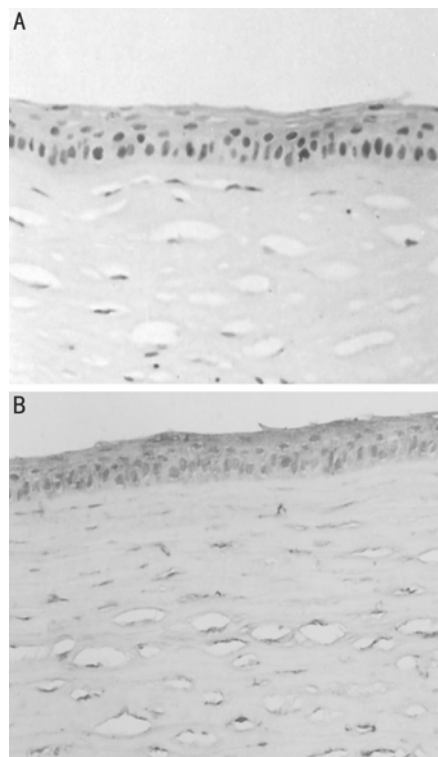


图 1 兔眼 AMT 术后 PDGF-BB 表达 (SABC × 200) A: 28d (-); B: 14d (+++)

表 1 兔眼 AMT 术后角膜新生血管长度的比较 ($\bar{x} \pm s$, mm, $n = 6$)

t/d	治疗组	对照组
7	1.97 ± 0.12	2.17 ± 0.15
14	3.55 ± 0.19 ^a	4.02 ± 0.26
21	4.87 ± 0.15 ^b	5.14 ± 0.18
28	5.05 ± 0.09 ^b	5.30 ± 0.13

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表 2 兔眼 AMT 术后角膜 PDGF-BB 的表达

分组	t/d	-	+	++	+++
治疗组	14	0	2	3	1
	28	1	1	4	0
对照组	14	2	3	1	0
	28	4	2	0	0

角膜白斑。治疗组病理变化过程与对照眼相似,但程度明显减轻。术后 7d 角膜烧伤区域分泌物少,边界清楚,无扩大倾向,14d 烧伤区域进一步局限,角膜溃疡开始收缩,21d 角膜及结膜仅有轻度水肿,溃疡接近愈合,28d 溃疡愈合,角膜组织无明显混浊。术后 7,14,21 和 28d 对角膜缘 12:00 处 CNV 进行长度测量并比较可发现,术后 7~28d,对照组 CNV 长度持续大于治疗组,差异有显著性 ($P < 0.05$, 表 1)。烧伤后 14d,对照眼仅部分角膜上皮及基质 PDGF-BB 呈阳性表达,以弱阳性表达为主,28d 表达进一步降低。治疗组表达较对照组普遍增强,至术后 28d,仅 1 例表达阴性,其余仍呈阳性表达(图 1)。经统计学分析,差异具有显著性 ($\chi^2 = 8.333, P = 0.04$, 表 2)。

2.2 房水 TNF-α 浓度变化 术后第 1d,对照组和治疗组房水中 TNF-α 均处于高峰,且含量接近 ($P > 0.05$),此后逐渐下降。其中治疗组下降速度快,与对照组比较在各时间点均有显著性差异 ($P < 0.05$),至术后第 28d,治疗组房水中 TNF-α 含量仅为对照组的 1/2(表 3)。

表 3 兔眼 AMT 术后房水中 TNF- α 含量的比较

($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}, n = 6$)

t/d	治疗组	对照组
1	360.2 \pm 20.2	373.0 \pm 10.4
7	315.5 \pm 19.8 ^a	363.0 \pm 28.5
14	254.7 \pm 17.4 ^b	342.4 \pm 22.4
21	226.4 \pm 17.2 ^b	315.0 \pm 15.8
28	140.6 \pm 11.5 ^b	283.5 \pm 19.9

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

3 讨论

新鲜羊膜移植能显著抑制眼内炎症,减少房水细胞数量,抑制 TNF- α 等炎症介质的活性,促进角膜修复^[3]。保存羊膜由于所含细胞活性因子和蛋白酶抑制剂减少,是否也具有类似新鲜羊膜的作用呢?研究发现,与对照眼比较,保存羊膜移植组眼内炎症反应轻,烧伤区域周围边界清,分泌物少,结膜充血程度轻,角膜溃疡愈合速度快,新生血管长度短,数量少。上述病理变化过程与我们在新鲜羊膜中观察的结果类似^[4],表明保存羊膜在角膜急性碱烧伤眼表重建中具有确切的疗效。

透明、无血管化是角膜的重要特征,而角膜新生血管化是一种严重威胁视力的并发症。研究发现新鲜羊膜具有较强的抗血管形成的特性,可能与所含蛋白酶抑制剂有关^[5,6]。我们发现,与对照眼生长旺盛的新生血管相比,羊膜移植组新生血管生长明显受到抑制,其新生血管数量少,管腔狭窄,分布稀疏,纤维增生不明显,上述结果也表明保存羊膜移植也具有显著的新生血管抑制功能。碱烧伤后大量炎细胞侵入前房,房水中 TNF- α 含量 4h 急剧升高,24h 达到高峰,48h 后维持在较高水平^[7]。烧伤后 7 ~ 14d 房水中活化的单核细胞达到高峰并继续分泌大量的 TNF- α ,加重眼内的炎症反应^[8]。本研究发现,碱烧伤行羊膜移植后 1d,房水中 TNF- α 含量达到高峰,而随时间推移,TNF- α 含量逐渐下降,保存羊膜组下降速度明显快于

对照组,至术后 28d,仅为对照组的一半,表明同新鲜羊膜一样,保存羊膜移植也能明显降低房水中 TNF- α 含量,减轻眼内炎症反应程度。

PDGF 在正常角膜上皮仅有少量表达,损伤后表达增加,能促进角膜细胞的分裂增殖。本研究显示,羊膜移植术后 PDGF-BB 的表达,无论在上皮细胞层,还是在基底层,均显著高于对照组,且表达更强,持续生活更长,至术后 28d,除 1 例表达阴性外,其它仍呈阳性表达。PDGF-BB 表达量的增减变化与角膜损伤修复的病理变化过程是一致的,提示 PDGF-BB 可能在角膜的损伤和修复过程中发挥重要作用,保存羊膜移植对 PDGF-BB 的表达起到有效的促进作用。

综上所述,我们认为虽然所含细胞活性因子和蛋白酶抑制剂数量较少,但深低温保存羊膜移植也具有明显的减轻炎症、抑制新生血管和促进上皮增殖的作用,其作用除为眼表重建提供基底膜外,与通过 TNF- α 途径抑制眼内炎症,PDGF 途径促进角膜上皮的修复有关。

参考文献

- 1 王峰,孙乃学,熊全臣,等.新鲜羊膜移植治疗早期重症眼部烧伤.眼科新进展 2003;23(4):278-279
- 2 杨蕊,王峰,孙乃学,等.新鲜羊膜移植在结膜囊成形术中的应用.中国修复重建外科杂志 2004;18(4):277-280
- 3 王峰,杜新华,常青.新鲜羊膜移植对兔角膜碱烧伤房水中 TNF- α 的影响.眼科新进展 2006;26(6):425-427
- 4 王峰,常青,杜新华.角膜急性碱烧伤新鲜羊膜移植后的组织病理学及超微结构观察.国际眼科杂志 2006;6(2):337-339
- 5 Arora R, Mehta D, Jain V. Amniotic membrane transplantation in acute chemical burns. Eye 2005; 19(3):273-278
- 6 周世有,陈家祺,刘祖国,等.羊膜移植重建急性期严重烧伤眼表的临床研究.中华眼科杂志 2004;40(2):97-100
- 7 黄伟奇,陈毓东,林翔.角膜碱烧伤房水炎性细胞因子变化的实验研究.眼外伤职业眼病杂志 2003;25(10):654-655
- 8 李立,汤永强,郭华兰.兔眼前段碱烧伤后房水细胞因子和一氧化氮在眼内炎症反应中的作用.重庆大学学报 2004;29(4):480-485