

不同浓度玻璃酸钠对新西兰兔干眼眼表变化的影响

王双勇^{1,2}, 田英¹, 程燕^{1,2}, 朱海峰^{1,2}, 吴洁^{1,2}

作者单位:¹(710002)中国陕西省西安市第一医院眼科;
²(710002)中国陕西省西安市,陕西省眼科研究所 陕西省眼科学重点实验室

作者简介:王双勇,毕业于中山大学中山眼科中心,眼科学博士研究生,主治医师,研究方向:眼表疾病、角膜病。

通讯作者:吴洁,毕业于西安交通大学医学院,主任医师,研究方向:眼表疾病、角膜病。tiannuo1979@163.com

收稿日期:2015-06-16 修回日期:2015-09-17

Effect of different concentrations of sodium hyaluronate on the ocular surface change of dry eye in New Zealand rabbits

Shuang-Yong Wang^{1,2}, Ying Tian¹, Yan Cheng^{1,2}, Hai-Feng Zhu^{1,2}, Jie Wu^{1,2}

¹Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; ²Shaanxi Ophthalmological Institute, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jie Wu. Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. tiannuo1979@163.com

Received: 2015-06-16 Accepted: 2015-09-17

Abstract

• AIM: To observe the effect of different concentrations of sodium hyaluronate on ocular surface change of dry eye.

• METHODS: New Zealand rabbits with dry eye was prepared and treated with 0.1% and 0.3% sodium hyaluronate drops fluid respectively, which were regarded as low concentration treatment group (group B) and high concentration treatment group (group C) respectively. However, the rabbits treated with saline were regarded as control group (group A). And then, corneal fluorescein staining, Schirmer test, conjunctival goblet cells, mucin expression and histological changes were observed.

• RESULTS: On D7 and D14 after treatment, corneal fluorescein staining scores were lower in group B and group C than that in group A ($P < 0.05$). However, Schirmer test, goblet cell density and mucin content were higher in group B and group C than those in A group ($P < 0.05$). Tear secretion and goblet cell density were higher in Group C than those in group B ($P < 0.05$). Compared with group B and group C, the thicknesses of corneal and conjunctival epithelial cell layer were thinner in group A. There were not obvious abnormalities in corneal and conjunctival stroma in each group.

• CONCLUSION: The sodium hyaluronate can improve ocular surface damage of dry eye in New Zealand rabbits. The high concentration of sodium hyaluronate has better effect than low concentration.

• KEYWORDS: sodium hyaluronate; dry eye; ocular damage

Citation: Wang SY, Tian Y, Cheng Y, et al. Effect of different concentrations of sodium hyaluronate on the ocular surface change of dry eye in New Zealand rabbits. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(10):1705-1708

摘要

目的:对比观察不同浓度的玻璃酸钠对干眼眼表变化的影响。

方法:制备新西兰兔干眼动物模型,使用1g/L玻璃酸钠和3g/L玻璃酸钠滴滴液治疗,分别作为低浓度治疗组(B组)和高浓度治疗组(C组),生理盐水治疗作为对照组(A组)。分别观察角膜荧光染色、泪液分泌试验、结膜杯状细胞及黏蛋白表达和组织学变化。

结果:治疗后D7和D14时,B组及C组角膜荧光染色评分低于A组($P < 0.05$),泪液分泌、杯状细胞密度及黏蛋白含量高于A组($P < 0.05$)。C组角膜泪液分泌和杯状细胞密度高于B组($P < 0.05$)。与B组和C组相比较,A组角膜及结膜上皮细胞层变薄,角膜及结膜基质未见明显异常。

结论:玻璃酸钠能够改善干眼眼表损害,且高浓度治疗效果优于低浓度。

关键词:玻璃酸钠;干眼;眼表损害

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.10.07

引用:王双勇,田英,程燕,等.不同浓度玻璃酸钠对新西兰兔干眼眼表变化的影响.国际眼科杂志2015;15(10):1705-1708

0 引言

干眼是一种多因素的泪液和眼表疾病,可引起眼部不适、视觉障碍和泪膜不稳定及眼表损害,伴有泪膜渗透压增加和眼表炎症^[1]。国内流行病学研究发现干眼的患病率大约在5.5%~33.7%^[2]。国外研究报道发病率大约在14.6%~28.7%^[3-4],随着电脑、手机等视频终端的普及,干眼的患病情况呈现上升及年轻化趋势,干眼的程度也有加重的趋势。玻璃酸钠是最常用的治疗干眼的人工泪液之一。本研究观察和比较不同浓度的玻璃酸钠对干眼眼表变化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 雌性新西兰白兔48只(西安交通大学医学实验动物中心购买),体质量2~2.5kg。实验动物饲养在

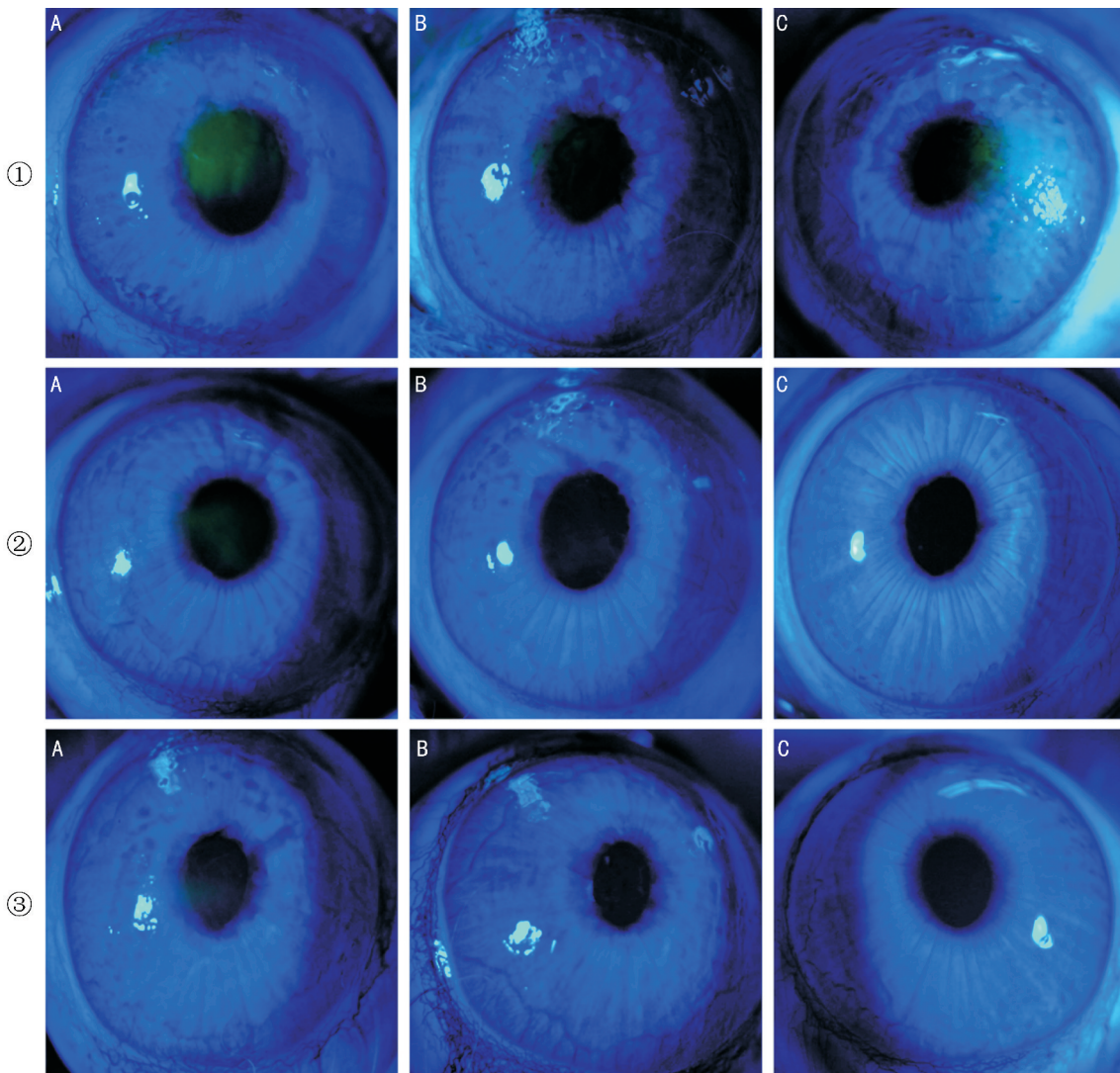


图1 角膜荧光染色,B组及C组治疗D7后角膜荧光染色评分明显好转,D14后角膜荧光染色基本消失,A组角膜荧光染色治疗前后无明显变化 ①:D0;②:D7;③:D14;A:A组;B:B组;C:C组。

标准环境下:室温 20℃ ~ 25℃,相对湿度 60% ~ 70%,明暗周期每 12h 交替(早上 8:00 ~ 晚上 8:00)。所有研究经陕西省眼科研究所实验动物伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 干眼动物模型的制作 依据之前的实验方法^[5],使用 0.1% 苯扎氯铵(BAC)制备干眼动物模型:所有实验动物使用 0.1% BAC 滴眼,每日两次,连续使用 2wk。将造模完成的实验动物随机分为以下三组:A组:接受生理盐水滴眼治疗;B组:接受 0.1% 玻璃酸钠滴眼液治疗;C组:接受 0.3% 玻璃酸钠滴眼液治疗。

1.2.2 角膜荧光染色评分 在进行实验的 D0、D3、D5、D7 和 D14,将 1% 荧光素钠滴加到结膜囊,2min 后固定架固定动物,使用裂隙灯显微镜钴蓝光观察角膜表面荧光染色,进行评分^[6]。

1.2.3 泪液检测 在进行实验的 D0、D3、D5、D7 和 D14,实验动物使用 50mg 氯胺酮和 25mg 氯丙嗪的混合物肌内注射麻醉。局部应用丙美卡因表面麻醉。将 Whatman 滤纸条放置于下方结膜囊(下睑中、外 1/3 交界处),5min 后取出,记录该纸带的润湿长度(mm)。

1.2.4 结膜印记细胞检测 在进行实验的 D0、D7 和 D14,同样方法麻醉实验动物,特制固定器固定实验动物。将直

径约 3.5mm 圆盘样硝化纤维素滤纸分别放置在鼻球结膜,滤纸粗面朝下,恒压滤纸约 10s,然后轻轻揭下,平整贴附于载玻片,并固定在 95% 酒精中 30min。使用苏木精和碘酸-希夫(PAS)试剂染色,光学显微镜观察标本,依据 Nelson 评分进行分级^[7]。

1.2.5 免疫荧光检测 MUC5AC 取实验动物鼻颞侧球结膜,冰冻切片,所有标本在 4℃ 下,使用丙酮固定 10min, PBS 洗涤 3 次,10% 山羊血清室温下封闭 30min,使用 1:150 稀释的小鼠抗兔 MUC5AC 抗体在 4℃ 下共育 12h, PBS 洗涤 3 次,羊抗小鼠荧光二抗室温下共育 45min,随后 PBS 洗涤 3 次, Hoechst 33342 复染。标本使用共焦激光扫描显微镜观察。

1.2.6 HE 染色进行组织学观察 角膜和结膜固定在 10% 福尔马林。脱水后,标本包埋在石蜡中(横截面),并用苏木精-伊红染色。

统计学分析:使用 SPSS 17.0 进行统计分析,实验资料进行组间方差分析或秩和检验, $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 角膜荧光染色评分结果 实验进行的 D3、D5、D7 和 D14 时,B组及C组角膜荧光素染色评分明显低于A组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。D3、D5、D7 时,C组角膜

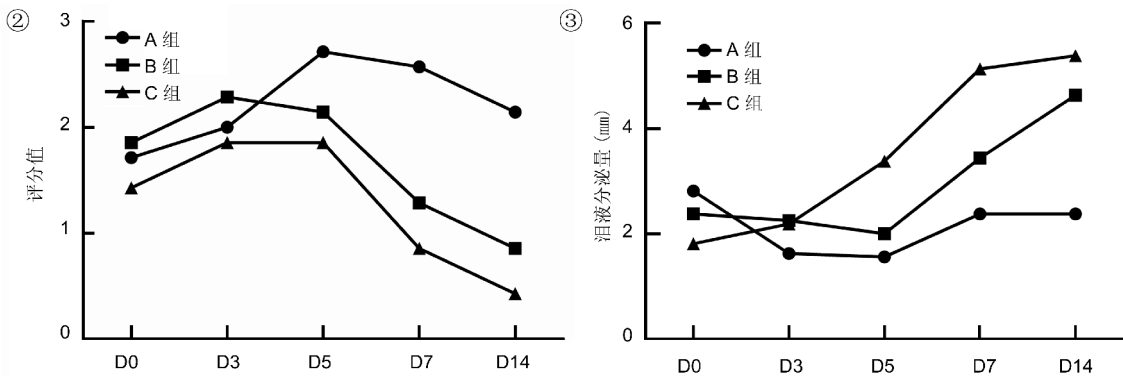


图2 角膜荧光染色评分,治疗后 D7 和 D14, B 组和 C 组角膜荧光染色评分逐渐降低, A 组治疗前后无明显变化。

图3 泪液分泌, B 组和 C 组治疗 D7 和 D14 后, 泪液分泌增多, A 组无明显变化。

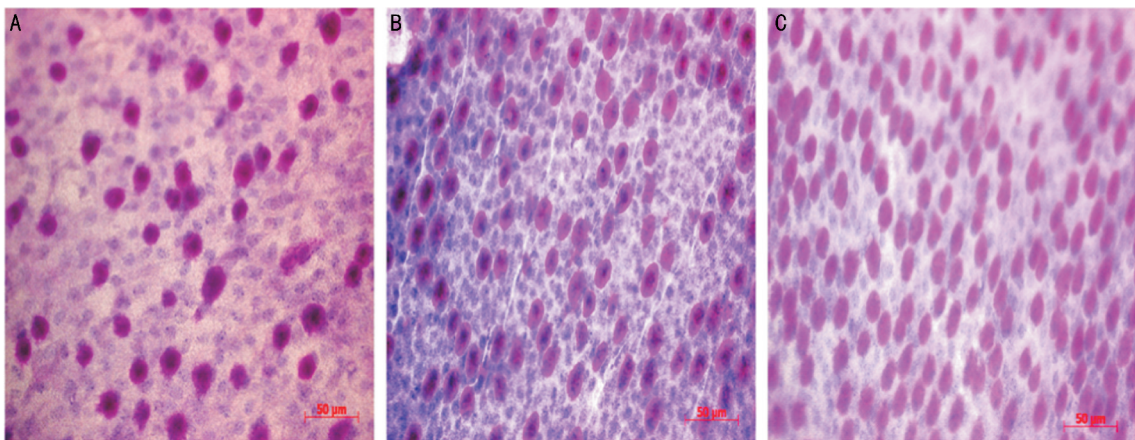


图4 角膜印记细胞检测:与 A 组比较, B 组和 C 组杯状细胞密度高, 黏蛋白含量高 A: A 组; B: B 组; C: C 组。

荧光染色低于 B 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。D14 时, B 组与 C 组无统计学差异 ($P > 0.05$, 图 1, 2)。

2.2 泪液分泌检测结果 实验进行的 D3、D5、D7, B 组及 C 组角膜泪液分泌与 A 组无统计学差异 ($P > 0.05$)。D14 时, B 组及 C 组角膜泪液分泌明显高于 A 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。D14 时, C 组角膜泪液分泌高于 B 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

2.3 印记细胞检测结果 B 组及 C 组结膜印记细胞检测杯状细胞比例均高于与 A 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。C 组杯状细胞比例高于 B 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4, 5)。

2.4 MUC5AC 免疫荧光检测结果 B 组及 C 组结膜可见较多含有黏蛋白的杯状细胞存在, 而 A 组缺乏黏蛋白阳性的杯状细胞 (图 6)。

2.5 组织学观察结果 光镜下, 与 B 组和 C 组相比较, A 组角膜及结膜上皮细胞层变薄, 角膜及结膜基质未见明显异常 (图 7)。

3 讨论

玻璃酸钠滴眼液是治疗干眼病患者最常用的治疗手段。玻璃酸钠是一种生物聚合物, 天然存在于所有脊椎动物中, 由 N-乙酰葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸钠反复交替组成的二糖单位构成, 具有高度的黏弹性、较好的生物相容性和非牛顿流体特性。

本研究中, 使用玻璃酸钠滴眼液明显改善干眼动物眼表损害, 促进眼表的修复。其作用和机制归纳如下几点: (1) 玻璃酸钠的具有良好的保水和润滑作用^[8-9], 其分子上带有大量负电荷, 可以吸附大量水, 从而润滑眼表, 改善干眼局部症状。此外, 在通常温度和湿度下, 玻璃酸钠

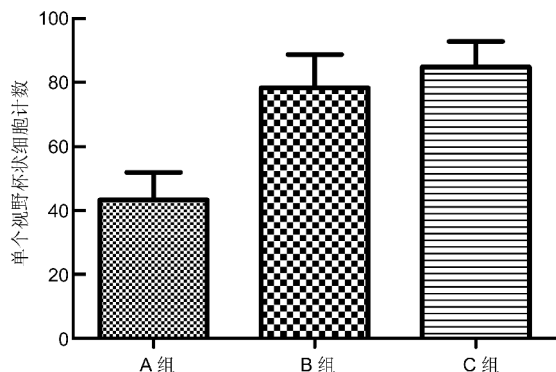


图5 印记细胞检测:与 A 组比较, B 组和 C 组杯状细胞密度高。

能够阻止和减慢溶液中水分的丢失, 正常人泪液蒸发率实验结果显示: 玻璃酸钠能增强角膜表面的保水性能, 因而它能增加角膜的保湿性^[10-11]。(2) 促进上皮愈合, 玻璃酸钠可以与纤维蛋白结合, 在角膜上形成一层保护膜, 加速上皮细胞的黏附和延展, 促进损伤角膜上皮的修复^[12-13]。(3) 稳定泪膜, 局部应用玻璃酸钠滴眼液后, 瞬目时其可以均匀地分布于眼球表面, 并形成交错的网状结构, 起到稳定泪膜的作用, 可最大限度地润滑眼表组织^[14]。此外, 玻璃酸钠滴眼液可能具有类黏蛋白样的作用, 角膜上皮具有与玻璃酸钠特异性结合位点, 从而使得其可以锚定于角膜上皮细胞, 稳定泪膜结构^[15]。

高浓度组眼表改善优于低浓度组, 分析原因可能由于 3g/L 玻璃酸钠浓度高, 眼表停留时间长, 在相同的滴眼频次时, 高浓度玻璃酸钠具有更好的保湿及润滑效果^[16]。

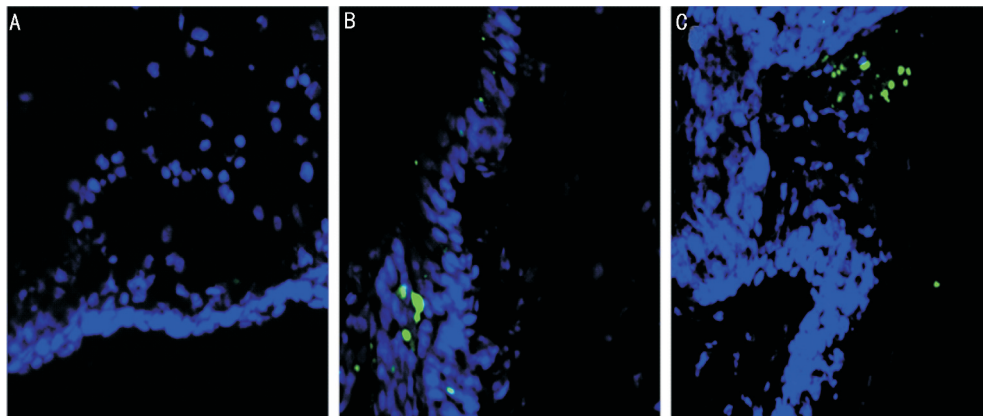


图6 MUC5AC免疫荧光检测,与B组和C组比较,A组MUC5AC阳性减少 A:A组;B:B组;C:C组。

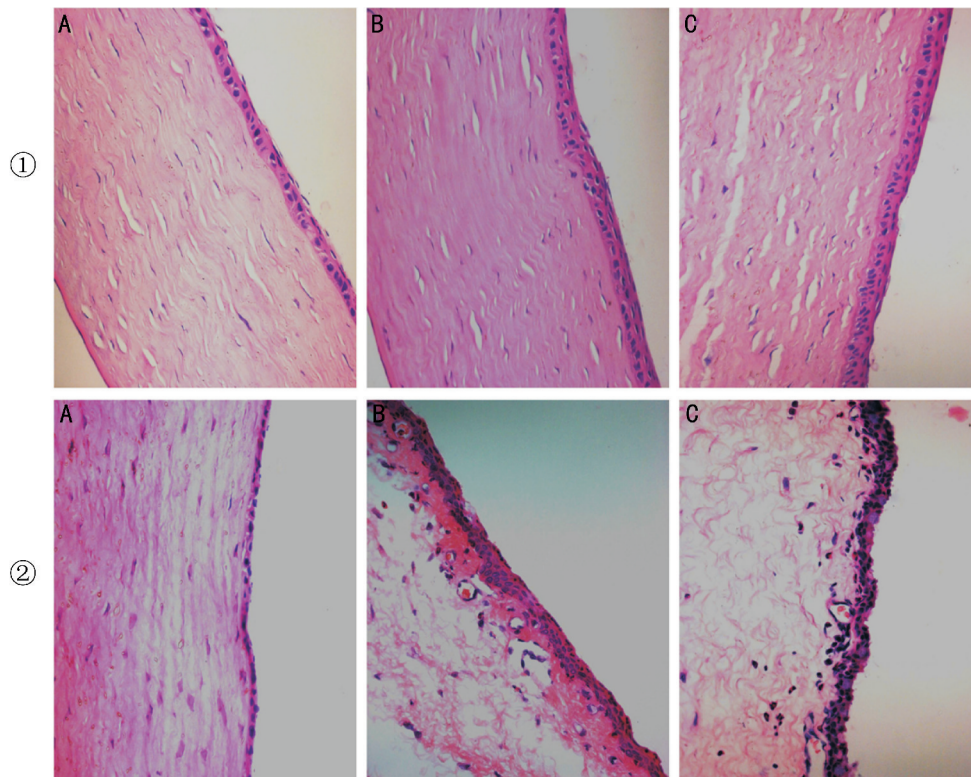


图7 组织学检测:与B组和C组相比较,A组角膜及结膜上皮细胞层变薄,角膜及结膜基质未见明显异常 ①:角膜;②:结膜;A:A组;B:B组;C:C组。

因此,相比较低浓度玻璃酸钠,高浓度玻璃酸钠能够更好地保湿润滑眼表,并较长时间存留眼表,能够明显缓解干眼症状,改善眼表损害,但临床应用效果尚需进一步观察。

参考文献

- 1 The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5(2):75-92
- 2 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 干眼临床诊疗专家共识(2013年). *中华眼科杂志* 2013;49(1):73-75
- 3 Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, et al. Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol* 1997;124(6):723-728
- 4 Moss SE, Klein R, Klein BE. Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol* 2000;118(9):1264-1268
- 5 Xiong C, Chen D, Liu J, et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(5):1850-1856
- 6 Pauly A, Brignole-Baudouin F, Labbe A, et al. New tools for the evaluation of toxic ocular surface changes in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(12):5473-5483
- 7 Nelson JD. Impression cytology. *Cornea* 1988;7(1):71-81

- 8 唐细兰,叶成添,陈雷宇. 玻璃酸钠在眼部的临床研究应用进展. *中国生化药物杂志* 2004;25(2):123-124
- 9 Tiffany JM, Winter N, Bliss G. Tear film stability and tear surface tension. *Curr Eye Res* 1989;8(5):507-515
- 10 韦春玲,王朝霞,王晓月,等. 物理治疗联合玻璃酸钠滴眼液治疗蒸发过强型干眼的疗效观察. *中国临床保健杂志* 2013;(5):505-506
- 11 Nakamura M, Hikida M, Nakano T, et al. Characterization of water retentive properties of hyaluronan. *Cornea* 1993;12(5):433-436
- 12 刘洁. 玻璃酸钠滴眼液治疗干眼症的临床观察. *按摩与康复医学(下旬刊)* 2010;1(10):60-61
- 13 蔡建园,李雷,刘肖艺,等. 透明质酸钠对超声乳化术后早期泪膜变化的影响. *国际眼科杂志* 2008;8(5):932-934
- 14 Condon PI, McEwen CG, Wright M, et al. Double blind, randomised, placebo controlled, crossover, multicentre study to determine the efficacy of a 0.1% (w/v) sodium hyaluronate solution (Fermavisc) in the treatment of dry eye syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999;83(10):1121-1124
- 15 Rolando M, Iester M, Macri A, et al. Low spatial-contrast sensitivity in dry eyes. *Cornea* 1998;17(4):376-379
- 16 Saeed N, Qazi Z, H Butt N, et al. Effectiveness of sodium hyaluronate eye gel in patients with dry eye disease: a multi-centre, open label, uncontrolled study. *Pak J Med Sci* 2013;29(4):1055-1058