

# 长期联合应用噻吗洛尔对结膜组织炎性反应的影响

彭 坤<sup>1</sup>, 许银霞<sup>2</sup>, 王保君<sup>1</sup>, 杨玉新<sup>1</sup>

基金项目: 中国新乡市科技局资助项目 (No. 08S022)  
作者单位: <sup>1</sup>(453100) 中国河南省卫辉市, 新乡医学院第一附属医院眼科; <sup>2</sup>(472000) 中国河南省三门峡市中心医院眼科  
作者简介: 彭坤, 男, 硕士, 讲师, 主治医师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。  
通讯作者: 彭坤. pengkun73@163.com  
收稿日期: 2011-08-31 修回日期: 2011-10-10

## Conjunctiva inflammatory changes induced by long time and combined treatment with timolol

Kun Peng<sup>1</sup>, Yin-Xia Xu<sup>2</sup>, Bao-Jun Wang<sup>1</sup>, Yu-Xin Yang<sup>1</sup>

**Foundation item:** Xinxiang Municipal Science and Technology Agency-funded Project, China (No. 08S022)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Sanmenxia Central Hospital, Sanmenxia 472000, Henan Province, China

**Correspondence to:** Kun Peng. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China. pengkun73@163.com  
Received: 2011-08-31 Accepted: 2011-10-10

## Abstract

• **AIM:** To observe conjunctival inflammatory reaction and expression of inflammatory marker ICAM-1 after long time treatment with anti-glaucoma eyedrops, and to investigate the impact on conjunctiva.

• **METHODS:** Ninety primary open-angle glaucoma patients were collected. All patients were divided into three groups in accordance with the type of treatment by using the anti-glaucoma drug: combined medication group of 30 cases, single drug treatment group of 30 cases; non-drug group of 30 cases. 30 cases with simple cataract acted as blank control group. Each group was divided into 3 time phrase (0-6, 7-12, 13-18 months) sub-groups by anti-glaucoma drug treatment time and cataract sick time, to conduct optical microscopy observation on conjunctival epithelial histomorphology and detect ICAM-1 expression.

• **RESULTS:** Single drug treatment group in applying drugs for 13-18 months had obvious bulbar conjunctival histology changes featured by its bulbar conjunctival epithelial tissue thickening, irregular shape, macrophages, lymphocytes, fibroblasts increase and irregular subconjunctival

fibrous connective tissue. Combined medication group in applying drugs for 13-18 months had obvious bulbar conjunctival histology changes featured by the bulbar conjunctival tissue with varying degrees of epithelial hyperplasia or metaplasia, uneven epithelial thickness, increased number of small blood vessels in subconjunctival tissue, and macrophages, lymphocytes, fibroblasts markedly increased, goblet cells decreased. In the 13-18 months time phrase, single drug treatment group and combined medication group, compared with the other groups in ICAM-1 positive cell number of conjunctival epithelial tissue, had statistically significant differences ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** The conjunctival tissue inflammatory response and conjunctival epithelial tissue's inflammatory marker ICAM-1 expression increased significantly.

• **KEYWORDS:** timolol; inflammatory marker; glaucoma; conjunctiva

Peng K, Xu YX, Wang BJ, *et al.* Conjunctiva inflammatory changes induced by long time and combined treatment with timolol. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(12):2099-2101

## 摘要

**目的:** 通过观察长期应用抗青光眼滴眼剂作用后结膜炎反应的发生和炎性标记物 ICAM-1 在眼部的表达, 探讨长期应用抗青光眼滴眼剂对结膜反应的影响。

**方法:** 从我科收住的原发性开角型青光眼患者 90 例, 分为三组: 应用 5g/L 噻吗洛尔与 2g/L 阿法根 (联合用药组) 30 例; 应用 5g/L 噻吗洛尔 (单一用药组) 30 例; 未用药组 30 例; 单纯白内障患者作为空白对照组 30 例。按抗青光眼药物治疗时间及白内障患病时间分为三个时相 (0~6mo, 7~12mo, 13~18mo) 组, 各个时相组 10 例, 进行结膜上皮组织形态学观察及检测结膜上皮组织中 ICAM-1 炎性标记物的表达。

**结果:** 单一用药组在用药 13~18mo 时其球结膜组织学改变明显, 表现为上皮形态不规则, 表面不平或有上皮分离或增生, 球结膜下纤维结缔组织排列不规则, 小血管增多, 巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞数增多。联合用药组在用药 13~18mo 时球结膜有明显的组织学改变, 上皮有不同程度的增生或鳞状化生, 上皮厚薄不均, 表面不光滑, 有上皮脱落, 球结膜下组织中小血管增多, 巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞数目明显增多、杯状细胞减少。单一用药组与联合用药组在 13~18mo 结膜组上皮组织中含 ICAM-1 抗原的阳性细胞数与其他组差别有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。  
**结论:** 长期联合应用抗青光眼药物可致结膜组织的炎性反应, 结膜上皮组织中的炎性标记物 ICAM-1 表达明显增加。

**关键词:** 噻吗洛尔; 炎性标记物; 青光眼; 结膜  
**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 12. 013

彭坤, 许银霞, 王保君, 等. 长期联合应用噻吗洛尔对结膜组织炎性反应的影响. 国际眼科杂志 2011; 11(12): 2099-2101

## 0 引言

研究表明, 长期应用抗青光眼类药物毛果芸香碱、 $\beta_2$ 受体阻滞剂及肾上腺素类药物易导致亚临床的结膜炎反应, 还可引起结膜鳞状化生, 并可以加速上皮细胞凋亡, 且与杯状细胞密度减少相关。术前长期抗青光眼药物治疗是滤过性手术失败的危险因子之一。本实验采用形态学和免疫组织化学方法, 观察单一用药及联合用药在不同时间阶段结膜炎性反应情况以及炎性标记物在结膜组织的表达情况, 探讨青光眼滴眼剂炎症反应发生的时间, 为减少抗青光眼用药时间, 预防副作用的发生, 增进青光眼滤过术后的效果, 提供理论依据。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

**1.1.1 主要实验仪器** TS-12J 生物自动脱水机(湖北孝感)、Leica SM2400 切片机、Leica Hi 展片机(德国) SHANG PING FA1104 电子天平及台式高速离心机(上海)、Galanz WD800TL23-K3 微波炉(广州)、新飞组合变频型冰箱 BCP-205(新乡)、电热恒温水浴箱 HH·W21·Cu600(上海)、Bx51/Bx52 系统 OLYMPUS 显微镜和 OLYMPUS 直立光照像系统(日本)。

**1.1.2 主要试剂及药物** 兔抗人 ICAM-1 单克隆抗体(编号 bs-0608R)、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(编号 SP-0023)、TDAB 染色试剂盒(C-0010), 以上均购自北京博奥森生物技术有限公司。FAA(100mL)固定液、固体石蜡、市售甲醛约(40%)、无水乙醇、950mL/L 乙醇、800mL/L 乙醇、600mL/L 乙醇、丙酮、二甲苯、苏木素、伊红、中性树脂, 以上取自新乡医学院第一附属医院实验室。

**1.1.3 研究对象** 从我科收住的患者中随机选择 40 岁以上无糖尿病、肾病及风湿病史, 局部麻醉及全身未用过糖皮质激素、裂隙灯下检查球结膜无微血管瘤、角膜缘无新生血管和眼部无炎症的原发性开角型青光眼患者 90 例, 根据抗青光眼药物治疗的种类分为三组: 应用两种青光眼药物治疗(5g/L 噻吗洛尔与 2g/L 阿法根)即联合用药组 30 例; 一种抗青光眼药物治疗(5g/L 噻吗洛尔)即单一用药组 30 例; 无抗青光眼药物治疗即未用药组 30 例。单纯白内障患者作为空白对照组 30 例, 眼部满足条件同原发性开角型青光眼患者。按抗青光眼药物治疗时间及白内障患病时间分为三个时相(0~6mo, 7~12mo, 13~18mo)组, 各个时相组 10 例。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本收集** 球结膜标本 90 例均系于小梁切除术时, 在位于角膜缘鼻上方 11:00~1:00 位, 以最小的创伤剪除至少 2mm×2mm 球结膜组织。30 例白内障患者做晶状体植入术时切除至少 2mm×2mm 球结膜组织(参与实验的患者知情并同意), 每次切除的球结膜组织立即放于装有 5mL FAA 固定液的小瓶中, 常温下固定, 固定时间至少 24h, 最多不超过 6mo, 所有标本常温下储藏。

#### 1.2.2 球结膜形态学检查

**1.2.2.1 标本处理** 球结膜组织与 FAA 固定液中取出,

放入包埋盒中, 常规梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋, 3 $\mu$ m 厚度切片, 行 HE 染色。

**1.2.2.2 标本形态学观察** 在高倍显微镜下进行球结膜形态学检查。

#### 1.2.3 免疫组织化学检查

**1.2.3.1 方法** 采用链霉素亲和素-生物素-过氧化物酶方法(SABC 法)。

**1.2.3.2 指标选择** ICAM-1 抗原。

**1.2.3.3 标本处理** 常规球结膜组织于 100g/L 中性甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 3 $\mu$ m 厚度切片。温控仪电热恒温干燥箱内 58 $^{\circ}$ C 烤片 1h。常规石蜡切片脱蜡至水。

**1.2.3.4 ICAM-1 免疫组织化学染色步骤** 蒸馏水洗 2min×3 次, 30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性酶, 室温 30min, 蒸馏水洗 2min×3 次。切片置于 0.01mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH6.0), 微波炉内加热使温度保持在 92 $^{\circ}$ C~98 $^{\circ}$ C 之间并保持 10~15min, 室温冷却 20min, 0.02mol/L PBS 洗 3min×3 次。滴加 50mL/L BSA 封闭液, 37 $^{\circ}$ C 30min, 甩去多余液体, 不洗。兔抗人 ICAM-1 单克隆抗体(1:100)作为一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 0.02mol/L PBS 洗 3min×3。滴加生物素化山羊抗兔 IgG 作为二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min, 0.02mol/L PBS 洗 3min×3 次。滴加试剂 SABC, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min, 0.02mol/L PBS 洗 5min×4 次。DAB 显色, 取 1mL 蒸馏水, 加 DAB 显色剂试剂盒中 A, B, C 试剂各 1 滴, 混匀后加至切片, 室温下避光显色, 显微镜下控制反应时间蒸馏水洗涤终止反应, 苏木素轻度复染, 分化, 蓝化, 脱水, 透明, 封片, 显微镜观察。整个实验过程中, 用 PBS 代替一抗作空白对照。

**1.2.3.5 免疫组织化学结果判定** 光镜下 ICAM-1 阳性结果表现为细胞膜或细胞核呈棕黄色或棕褐色。

**1.2.3.6 免疫组织化学结果定量方法** ICAM-1 染色结果在 400 倍镜下每例切片随机选择 10 个不重叠的视野, 每张标本连续选择四张切片, 分别计数每个视野 ICAM-1 阳性细胞数目, 计数其平均值。

统计学分析: 应用 SPSS 13.0 统计软件分析, 各组数据均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 形态学观察** 应用光镜观察到未用药组与空白对照组的球结膜上皮组织表现为正常。联合用药组与单一用药组在用药 12mo 以下时其球结膜上皮组织也基本上表现为正常。单一用药组在用药 13~18mo 时其球结膜组织学改变明显, 表现为上皮形态不规则, 表面不平或有上皮分离或增生, 球结膜下纤维结缔组织排列不规则, 小血管增多, 巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞数增多。联合用药组在用药 13~18mo 时球结膜有明显的组织学改变, 上皮有不同程度的增生或鳞状化生, 上皮厚薄不均, 表面不光滑, 有上皮脱落, 球结膜下组织中小血管增多, 巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞数目明显增多, 杯状细胞减少。有 3 例表现有亚临床性炎症改变。ICAM-1 阳性结果表现为细胞膜或细胞核呈棕黄色或棕褐色。

**2.2 结膜上皮组织中含 ICAM-1 免疫组化染色结果** 免疫组织化学染色检测结膜上皮组织 ICAM-1 阳性细胞, 在抗青光眼滴眼剂作用 0~6mo, 7~12mo 时间点上, 单一用药组及联合用药组均无明显增多( $P > 0.05$ ), 抗青光眼滴

表1 结膜上皮组织中含 ICAM-1 免疫组化染色结果 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

分组	n	0~6mo	7~12mo	13~18mo
联合用药组	30	6.27 ± 1.39	7.07 ± 1.32	32.61 ± 1.53 <sup>a</sup>
单一用药组	30	6.21 ± 1.45	6.89 ± 1.31	22.59 ± 1.85 <sup>a</sup>
未用药组	30	5.74 ± 0.97	5.43 ± 1.34	5.38 ± 2.31
空白对照组	30	4.98 ± 1.65	5.45 ± 1.73	5.12 ± 1.14

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs 空白对照组。

眼剂作用 13~18mo 时,单一用药组及联合用药组结膜上皮组织中含 ICAM-1 抗原的阳性细胞数均明显增多,有显著性差异( $P < 0.01$ ),而联合用药组增加更明显。空白对照组与未用药组结膜上皮组织中含 ICAM-1 抗原的阳性细胞数各时间点均维持在较低水平上,其差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

目前还不清楚局部滴用抗青光眼药物后导致纤维母细胞和某些炎性细胞增加的确切机制,有些学者认为可能是药物本身或其中防腐剂对局部组织的刺激,引起轻度的亚临床炎症,从而间接地刺激纤维母细胞增生。抗青光眼药物中添加的防腐剂有多种,通常有氯化苯甲胺(benzalkonium chloride, BAC)、硫柳汞、尼泊金、洗必泰等。一些在体内和体外研究表明,最常见的防腐剂是氯化苯甲胺,它的毒副作用可能最大。研究发现抗青光眼药物中的防腐剂可以诱发非常严重的毒性反应。BAC 会导致结膜杯状细胞减少<sup>[1]</sup>,引起基础泪液分泌减少,还能引起球结膜炎、点状角膜炎、睑缘炎、结膜纤维化和干眼症<sup>[2-4]</sup>。临床上可造成误诊为角膜炎或眼部过敏而加用抗生素、抗病毒或抗过敏滴眼液,从而加重眼部症状<sup>[5]</sup>。

本实验中上皮内的巨噬细胞、淋巴细胞增加,浅固有层的纤维母细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、肥大细胞增加、深固有层的纤维母细胞、巨噬细胞数量增加,杯状细胞减少。提示 10g/L 匹罗卡品和 2g/L 阿法根滴眼液中的某些成分可能具有一种外源性抗原的作用,当长期使用一段时间后可引起局部组织轻度的炎症反应或过敏反应,从而刺激纤维母细胞增生。ICAM-1 在正常情况下表达很低,在炎症等作用下表达较高。长期应用抗青光眼药物 1a 后存在炎症反应,表达 ICAM-1 的阳性细胞就相应增多。

当长期滴用抗青光眼药物,尤其是多种药物联合使用时,结膜的上皮层内的炎性细胞增多,引起亚临床结膜炎。Schwartz 等<sup>[6]</sup>也发现, $\beta$ -受体阻滞剂还能抑制角膜上皮细胞增生,降低角膜知觉敏感性。BAC 可损伤角膜上皮,并增加角膜的通透性。

抗青光眼的眼表用药可能会改变结膜成纤维细胞的性状,使其组织更加紧密且更加富含胶原纤维,从而对之

后进行的抗青光眼滤过术起到副作用,导致手术失败<sup>[7,8]</sup>。张佳莹等<sup>[9]</sup>研究了转化生长因子  $\beta$  在结膜成纤维细胞上的表达,发现使用抗青光眼药物 1a 以上青光眼组 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 水平上均被成纤维细胞表达,且青光眼组 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 在 mRNA 平上的表达均显著高于对照组。并推断青光眼患者的结膜成纤维细胞中发现的转化生长因子  $\beta$  的增强表达改变了结膜成纤维细胞的生理状态,提高其增殖能力,有效的调整了结膜瘢痕反应,致使术后切口早期愈合,导致滤过术失败。

本文研究提示,无论单一或联合应用抗青光眼药物,长期滴用 1a 以上,就会引起明显的结膜炎反应。虽然新型抗青光眼滴眼剂前列腺素衍生物的应用<sup>[10]</sup>,可以减少眼表的毒副作用,甚至会起到潜在的保护作用,但其所含的防腐剂仍会对结膜组织产生影响。对于一些需长期用药的青光眼患者来说,研发不含防腐剂的抗青光眼滴眼剂仍是我们的迫切需要。

### 参考文献

- 1 Kahook MY, Noecker R. Quantitative analysis of conjunctival goblet cells after chronic application of topical drops. *Adv Ther* 2008;25(8):743-751
- 2 Pisella PJ, Pouliquen P, Baudouin C. Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication. *Br J Ophthalmol* 2002;86(4):418-423
- 3 Martone G, Frezzotti P, Tosi GM, et al. An *in vivo* confocal microscopy analysis of effects of topical antiglaucoma therapy with preservative on corneal innervation and morphology. *Am J Ophthalmol* 2009;147(4):725-735
- 4 Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S. Comparison of the short-term effects on the human corneal surface of topical timolol maleate with and without benzalkonium chloride. *J Glaucoma* 2003;12(6):486-490
- 5 卢艳. 局部抗青光眼药物治疗导致眼表毒性反应误诊临床分析. *国际眼科杂志* 2008;8(12):2549-2550
- 6 Schwartz GS, Holland EJ. Iatrogenic limbal stem cell deficiency: when glaucoma management contributes to corneal disease. *J Glaucoma* 2001;10(6):443-445
- 7 Milazzo G, Carstoccea B, Gatencu M, et al. Ocular surface changes induced by carteolol and timolol. *Int J Ophthalmol (Guoj Yanke Zazhi)* 2003;3(1):43
- 8 Yucel I, Akar Y, Bagei G. The effect of various antiglaucomatous drugs on subconjunctival fibroblast cell culture. *Int J Ophthalmol (Guoj Yanke Zazhi)* 2003;3(1):106
- 9 张佳莹,冷非,彭绍民. 抗青光眼眼表药物与人结膜成纤维细胞 TGF- $\beta$ , MMP 的表达. *国际眼科杂志* 2007;7(5):1294-1297
- 10 Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P, et al. Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an *ex vivo* and *in vitro* study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(5):1360-1368