

海藻糖对鼠蒸发过强型干眼模型结膜杯状细胞的影响*

翟丽丽¹, 刘 华²

Effect of trehalose on conjunctival goblet cells in a rat model of excessive evaporative xerophthalmus

Zhai Li-li¹, Liu Hua²

Abstract

BACKGROUND: In recent years, studies have shown that trehalose effectively reduce mortality of the corneal epithelial cells in the dry environment. So, it may be used as a kind of new drug for xerophthalmus.

OBJECTIVE: To observe the healing effect of trehalose on a rat model of excessive evaporative xerophthalmus.

METHODS: A total of 15 SD rats (30 eyes) were randomly divided into normal, control, and experimental groups, with 5 rats for each group (10 eyes). The normal group was not treated, and the other two groups were made into xerophthalmus models by preventing nictation to expose conjunctiva. The control and treatment groups were dripped by normal saline and trehalose eyedrops to eyes after 24-hour exposure in 2 weeks, for 4 times per day. Shimer I test and fluorescence staining test were carried on after 1, 3, 5, 7 and 14 days, respectively. At the same time, the density of conjunctival goblet cell was detected by conjunctival impression cytology. The conjunctiva and cornea were taken out to do pathological examination after 14 days.

RESULTS AND CONCLUSION: There was no significant difference in Shimer I test among normal, control, and experimental groups ($P > 0.05$); but there was statistically significant difference in the result of corneal fluorescein staining among normal, control, and experimental groups ($P < 0.05$). On the 3rd, 7th, and 14th days, fluorescence staining scores of cornea in the experimental group were significantly less than control group ($P < 0.05$). Squamous metaplasia degeneration of conjunctiva appeared in both control and experimental groups, and the conjunctival goblet cell density was increased after treatment, which was significant difference compared with normal group ($P < 0.05$). The goblet cell density in the experimental group was increased at 3, 5, 7 and 14 days after exposure compared with control group ($P < 0.05$). Pathological examination showed that a large number of inflammatory cells emerged in the cornea in the control group, while inflammatory cells were not observed in the experimental group, suggesting that trehalose inhibited decreasing of conjunctival goblet cells and effectively cured exposed xerophthalmus.

Zhai LL, Liu H. Effect of trehalose on conjunctival goblet cells in a rat model of excessive evaporative xerophthalmus. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(12): 2123-2126. [http://www.crter.cn http://en.zgclckf.com]

摘要

背景: 近年来研究表明海藻糖可以有效降低角膜上皮细胞在干燥环境中的死亡率, 有可能成为一种治疗干眼症的新型药物。
目的: 评价海藻糖滴眼液对大鼠蒸发过强型干眼疗效。

方法: SD 大鼠 15 只(30 只眼), 采用随机数字表法分为正常组、对照组和实验组, 每组 5 只(10 只眼)。正常组不予处置, 后 2 组通过机械性阻止大鼠瞬目, 暴露角结膜制作干眼模型。对照组和治疗组暴露 24 h 后分别给予生理盐水、海藻糖滴眼液点双眼, 4 次/d, 共 2 周。分别于暴露后 1, 3, 5, 7, 14 d 进行 Shimer I 试验、荧光染色; 同时应用结膜印迹细胞学检测结膜杯状细胞密度。于暴露 14 d 后取双眼结膜、角膜, 行病理学检查。

结果与结论: 正常组与对照组和实验组的 Shimer I 试验结果比较差异均无显著性意义($P > 0.05$)。正常组与对照组和实验组角膜荧光素染色结果比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 实验组第 3, 7, 14 天角膜荧光素染色积分明显少于对照组($P < 0.05$)。对照组和实验组均导致了结膜鳞状化生的退化, 用药后结膜杯状细胞密度随着时间的延长逐渐增加, 与正常组比较差异均有显著性意义($P < 0.05$)。实验组杯状细胞密度在暴露第 3, 5, 7, 14 天明显高于对照组($P < 0.05$)。病理检查结果显示对照组角膜组织中出现明显的炎症细胞浸润, 实验组结膜组织中未发现明显的炎症细胞浸润。结果提示海藻糖滴眼液可以抑制结膜杯状细胞数目的减少, 对蒸发过强型干眼有一定的治疗效果。

关键词: 干眼; 海藻糖; 结膜; 杯状细胞; 生物材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.12.009

翟丽丽, 刘华. 海藻糖对鼠蒸发过强型干眼模型结膜杯状细胞的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(12):2123-2126. [http://www.crter.org http://cn.zgclckf.com]

0 引言

干眼是目前最常见的眼表疾病之一, 主要由泪膜的异常引起。泪膜的稳定有赖于黏蛋白持续、稳定地供给, 黏蛋白主要来源于结膜杯状细胞, 因此杯状细胞质和量的异常均可导致干眼的发生^[1]。动物模型是进行临床和基础研

究的重要手段和载体, 根据干眼症的假定发病原因, 如通过阻止其瞬目, 成功快速制作动物模型, 是研究干眼症发病机制的基础。干眼症患者泪液分泌异常、泪膜稳定性降低, 角膜表面染色可对诊断干眼症动物模型的眼表损害提供参考, 诊断结果亦可为临床诊断干眼症提供依据。

由于海藻糖具有保护生物细胞和生物活性

¹Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China;
²Yadong Eye Hospital, Jinzhou Central Hospital, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Zhai Li-li★, Studying for master's degree, Physician, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
yujiazll@126.com

Correspondence to: Liu Hua, Doctor, Yadong Eye Hospital, Jinzhou Central Hospital, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Received: 2010-01-03
Accepted: 2010-02-17

¹ 辽宁医学院, 辽宁省锦州市 121001; ² 锦州市中心医院亚东眼病医院, 辽宁省锦州市 121001

翟丽丽★, 女, 1982 年生, 吉林省松原市人, 汉族, 辽宁医学院在读硕士, 医师, 主要从事临床眼表疾病的研究。
yujiazll@126.com

通讯作者: 刘华, 博士, 锦州市中心医院亚东眼病医院, 辽宁省锦州市 121001

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)12-02123-04

收稿日期: 2010-01-03
修回日期: 2010-02-17
(20100103001/M•H)

物质在脱水等不良环境下活性不受破坏的独特生物学性质, 本实验主要观察海藻糖滴眼液对鼠蒸发过强型干眼疗效, 并探讨其作用机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2009-04/12在辽宁医学院动物实验中心完成。

材料:

实验动物: 健康SD大鼠15只, 雌雄兼用, 平均体质量为220 g, 由辽宁医学院实验动物中心提供。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

主要试剂:

主要试剂	来源
海藻糖配成 100 mmol/L 滴眼液	北京拜迪尔生物技术有限公司
2%荧光素钠、泪液分泌试纸	天津晶明新技术开发有限公司
醋酸纤维膜	北京升河诚信生物有限公司

实验方法:

动物模型制作与分组: 参照田明霞等^[2]的法制作干眼模型, 操作如下: 10%水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉, 全麻成功后将大鼠固定于固定板上, 消毒眼周皮肤, 用1号黑丝线褥式缝合上下眼睑并分别固定于眶周相应皮肤上, 共计24 h。采用随机数字表法分为正常组、对照组和治疗组, 每组5只(共10只眼)。正常组不给予任何处置, 后2组通过机械性阻止大鼠瞬目, 暴露角膜制作干眼模型。对照组和治疗组暴露24 h后分别给予生理盐水、海藻糖滴眼液点双眼, 4次/d, 共2周。3组动物均由同一人检查, 每次检查时间、地点、照明强度、温度相同, 分别于暴露后1, 3, 5, 7, 14 d进行Shirmer I试验、荧光染色; 同时应用结膜印迹细胞学检测结膜杯状细胞密度。于14 d后取双眼结膜、角膜, 行病理学检查。

Schirmer I试验: 考虑大鼠眼睛小, 用上述泪液检测滤纸条检查不合适, 结果亦会有较大误差, 遂将其剪成两半, 即变成2.5 mm×35 mm大小, 从5 mm处折叠直角, 夹在大鼠下眼睑外侧结膜囊内, 另一端垂挂在下睑外部。5 min后测量滤纸湿润长度(不包括反折)。

荧光素染色: 用玻璃棒蘸2%荧光素钠涂于大鼠下睑结膜囊内, 使其瞬目后于裂隙灯下观察, 评分方法将角膜分为4个象限, 规定无染色为0, 有染色则分轻、中、重3级, 因此共0~12分^[3]。

结膜印迹细胞检查: 参照Chan等^[4]的方法, 检测前结膜囊先滴1%爱尔卡因1滴, 5 min后滤纸吸取结膜囊泪

液, 将剪好的3 mm×3 mm醋酸纤维膜的粗糙面贴于距上方角膜缘2 mm的球结膜表面, 轻轻加压, 3~5 s之后撕下, 然后于其左右相邻的区域再各贴一张, 于体积分数为95%乙醇固定10~30 min, 然后依次用0.5%高碘酸氧化, 过碘酸希夫染色剂染色, 偏重亚硫酸漂洗, 苏木精复染, 二甲苯透明, 中性树脂封固, 置于双目光学显微镜下检查杯状细胞。结膜杯状细胞计数参照Blodi标准^[5]: 计算每只动物所取3张标本中共10个高倍镜(×400)下杯状细胞总数的平均值。

病理学检查: 将3组动物饲养2周后以麻醉过量法处死, 立即摘除其结膜、角膜, 置于40 g/L多聚甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 切片, 予常规苏木精-伊红染色, 光学显微镜检查。

主要观察指标: ①泪液分泌试验测量滤纸湿润长度。②角膜荧光素染色得分。③印迹细胞学检查结膜杯状细胞密度。④病理学检查杯状细胞增生、炎性细胞浸润情况。

设计、实施、评估者: 设计为第一作者, 收集资料为第一作者, 实施为第一、二作者, 评估为第二作者。均经过系统专业培训。

统计学分析: 应用SPSS 16.0软件进行统计学分析。应用重复测量方差分析及均数多重比较检验。分析暴露后各观察期各项指标的变化及组间各项指标平均值的差异。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 参加实验的15只大鼠均进入结果分析。

2.2 Schirmer I及荧光染色检查结果 正常组与对照组和实验组的Schirmer I试验结果比较差异均无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

Group	After modeling	Day 1	Day 3
Normal	6.60±1.71	6.80±1.54	6.30±1.82
Control	6.50±1.95	6.40±1.89	6.40±1.83
Experimental	6.70±1.63	6.50±1.35	6.10±1.79
Group	Day 5	Day 7	Day 14
Normal	7.00±1.63	7.20±1.87	6.70±1.76
Control	6.60±1.95	6.30±1.63	6.70±1.63
Experimental	6.80±1.22	6.90±1.85	7.20±1.68

$P > 0.05$, among three groups

正常组与对照组和实验组角膜荧光素染色结果比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 实验组第3, 7, 14天角膜荧光素染色积分明显少于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组荧光染色积分比较
Table 2 Comparison of staining scores in different groups ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Group	After modeling	Day 1	Day 3
Normal	0	0	0
Control	8.60±0.96 ^a	8.50±1.08 ^a	8.20±1.22 ^a
Experimental	8.70±0.94 ^a	8.40±1.07 ^a	6.50±1.35 ^{ab}

Group	Day 5	Day 7	Day 14
Normal	0	0	0
Control	8.00±1.24 ^a	8.10±1.19 ^a	8.20±1.03 ^a
Experimental	5.90±1.91 ^{ab}	4.80±1.03 ^{ab}	3.60±1.26 ^{ab}

^a $P < 0.05$, vs. normal group; ^b $P < 0.05$, vs. control group

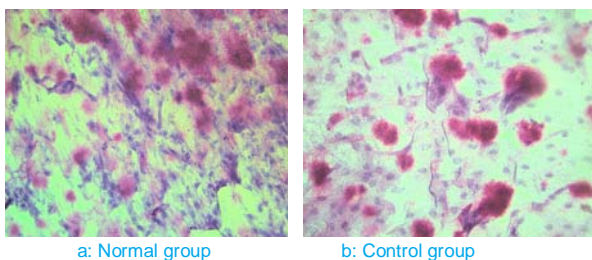
2.3 结膜杯状细胞密度 对照组和实验组均导致了结膜鳞状化生的退化, 用药后结膜杯状细胞密度随着时间的延长逐渐增加, 与正常组比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。实验组杯状细胞密度在造模第3天开始逐步上调, 对照组未见明显上调作用, 两组差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。实验组在第5, 7, 14天均比对照组明显增高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。见表3和图1。

表3 各组结膜杯状细胞密度比较
Table 3 Comparison of conjunctiva goblet cell density in different groups ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Group	After modeling	Day 1	Day 3
Normal	164.50±4.19	164.40±4.42	165.70±4.19
Control	85.90±3.60 ^a	87.20±3.79 ^a	93.60±4.16 ^a
Experimental	85.80±3.22 ^a	86.40±3.30 ^a	100.60±8.26 ^{ab}

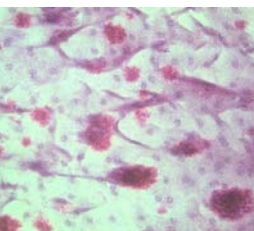
Group	Day 5	Day 7	Day 14
Normal	167.30±3.05	166.70±4.69	166.60±3.20
Control	95.40±2.22 ^a	103.50±3.62 ^a	127.30±4.11 ^a
Experimental	108.50±4.22 ^{ab}	125.90±2.88 ^{ab}	145.50±4.88 ^{ab}

^a $P < 0.05$, vs. normal group; ^b $P < 0.05$, vs. control group



a: Normal group

b: Control group



c: Experimental group

Figure 1 Conjunctival goblet cells at 2 weeks after exposure (PAS staining, $\times 400$)

图1 各组暴露2周后结膜杯状细胞(PAS糖元染色, $\times 400$)

2.4 病理学检查结果 正常组角膜上皮层、前弹力膜、基质层、后弹力膜和内皮层清晰可见, 上皮层光滑完整, 浅层为两三层扁平上皮细胞, 中间层为一两层翼状上皮细胞层, 基底层为立方上皮细胞, 排列紧密, 基底膜完整。结膜可见上皮层和结膜下组织层, 上皮层为四五层排列整齐的柱状上皮, 上皮细胞层完整光滑, 细胞紧密压缩, 核椭圆淡染, 其间见富含分泌颗粒的杯状细胞。暴露14 d后, 对照组角膜上皮层层次增加, 扁平细胞见不规则片状脱落; 结膜上皮层细胞层次增加, 扁平细胞见不规则片状脱落, 基质层内见大量炎性细胞浸润(图2)。

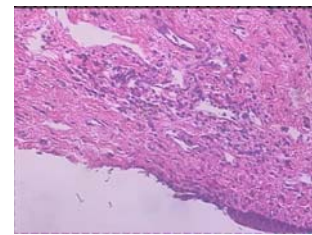


Figure 2 Conjunctival sections in the control group at 2 weeks after exposure (HE staining, $\times 200$)

图2 对照组暴露2周后结膜组织切片(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

实验组上皮层细胞层次增加, 局部扁平细胞见不规则少量脱落。结膜上皮层细胞层次增加, 局部扁平细胞见少量不规则脱落, 杯状细胞增生, 基质细胞成分增多, 可见嗜酸性粒细胞、分叶核细胞等浸润(图3)。

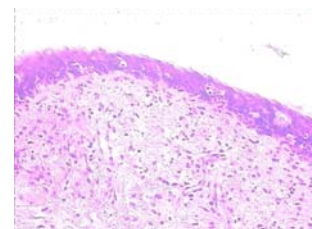


Figure 3 Conjunctival sections in the experimental group at 2 weeks after exposure (HE staining, $\times 200$)

图3 实验组暴露2周后结膜组织切片(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

3 讨论

干眼是指由于泪液质和量的异常引起的泪膜不稳定和眼表损害而致眼部不适的一类疾病。目前干眼的诊断分类标准仍没有统一, 刘祖国^[6]据维持稳定泪膜的要素建议将干眼分为5类: 蒸发过强型干眼、水液缺乏型干眼、黏蛋白缺乏型干眼、泪液动力学异常型干眼、混合型干眼。近年来随着计算机的广泛应用, 使一些长期从事计算机操作者出现干眼症状而其泪腺分泌功能基本正常, 原因是由于在空调环境中工作时精神集中, 瞬

目次数减少, 泪液蒸发增加所致^[7]。

海藻糖是一种生物大分子非特异性的天然生物保护剂, 化学性质十分稳定, 除具有低聚糖的一般特性, 还有独特的生物学特性, 可在严酷环境下保护生物体的组织和分子的功能和活性, 在病毒、疫苗及组织器官保存、食品加工和储藏、农作物育种及药品添加剂等方面有广泛的应用^[8]。海藻糖是一种广泛存在于酵母、真菌、海藻和许多生物体内的非还原性双糖, 由两分子葡萄糖通过半缩醛羟基脱水而成。海藻糖是其抵御伤害的基础, 具有稳定细胞膜、蛋白质和核酸结构, 保护生物体的作用。Matsuo^[9]示海藻糖可有效降低角膜上皮细胞在干燥环境中的死亡率, 可能成为一种治疗干眼综合征的新型药物。

本实验结果显示正常组大鼠角结膜在裂隙灯下光滑、有光泽, 荧光素染色阴性; 而对对照组和实验组大鼠角结膜干燥、无光泽, 出现角化、片状上皮缺损、新生血管形成, 荧光素染色阳性, 对照组和实验组第1天时荧光素染色积分差异无显著性意义($P > 0.05$); 随着时间的延长, 荧光素染色积分逐渐降低, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。Schirmer I试验表明3组泪液未见明显减少, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 说明此类干眼是由于瞬目频率减少后泪液蒸发过快有关。泪膜中水分的快速蒸发可导致电解质浓缩及蛋白质分子分解, 增加泪膜渗透压和角膜组织脱水, 使眼表上皮干燥失活。有学者研究表明泪腺组织在光镜下未出现明显异常, 未见炎症细胞的浸润或泪腺细胞的萎缩, 与泪液生成不足型干眼的病理改变不完全一致^[10]。

杯状细胞、结膜上皮细胞及主副泪腺可分泌黏液, 这些黏液为具有表面活性的黏蛋白, 带有水溶性及脂溶性, 能降低泪膜表面张力, 同时, 泪膜的光滑完整性也依赖于眼表黏液的活性, 泪膜中黏蛋白在角膜上皮细胞表面形成一层多糖被, 使得角膜表面从疏水性转化为可湿润的亲水性, 增加水-黏蛋白在眼表的分布能力, 以形成完整的泪膜湿润眼表^[11]。杯状细胞在维持眼表健康、保持清晰视力及防御微生物感染方面有着重要的作用。当各种内、外源性因素引起杯状细胞数量或分泌功能改变时, 可产生眼干、视物不清等眼部不适。很多眼部疾病、手术、药物及眼部微环境的改变等均可使杯状细胞数量减少, 导致眼表稳定性破坏而引起多种眼表疾病^[12]。杯状细胞在维护眼表稳定性方面的重要性已日益受到关注。结膜上皮细胞作为眼表防御系统的一部分, 不仅能够维持眼表环境的稳定, 其细胞间隙还可作为物质交换的通道, 发挥免疫作用及药物的转运^[13]。本实验由于泪液蒸发过多导致眼表损害, 结果显示, 给药2周后实验组与对照组相比杯状细胞数目有所增加, 差异有显著性意义; 提示用药时间的延长, 结膜杯状细胞的数量和分泌功能逐渐恢复, 以维持眼表的正常功能。

说明海藻糖滴眼液通过杯状细胞的修复达到治疗干眼症。病理检查结果显示, 对照组角膜组织中出现明显的炎症细胞浸润, 说明当干眼发展到一定程度以后, 除了眼表面干燥之外, 还存在明显的炎症反应; 实验组角结膜组织中未发现明显的炎症细胞浸润, 表明海藻糖滴眼液可以减轻眼表炎症反应的作用, 估计是可以润滑眼表, 减少眼表摩擦及减轻眼表干燥有关。

综上所述, 海藻糖滴眼液在治疗蒸发过强型干眼有一定治疗效果, 可恢复受损的结膜杯状细胞, 提示海藻糖滴眼液对干眼的治疗具有一定的应用前景。

4 参考文献

- [1] Murube J, Rivas L. Impression cytology on conjunctiva and cornea in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *European J Ophthalmology*. 2003;13(2):115-127.
- [2] Tian MX, Wang CF, Yanke Yanju. 2007;25(2):105-108. 田明霞, 王传富. 暴露性干眼病大鼠模型结膜上皮细胞凋亡相关基因的表达[J]. *眼科研究*, 2007, 25(2):105-108.
- [3] Afonso AA, Monroy D, Stern ME, et al. Correlation of tear fluorescein clearance and Schirmer test scores with ocular irritation symptoms. *Ophthalmology*. 1999;106(4):803-810.
- [4] Chan CM, Liu YP, Tan DT. Ocular surface changes in pterygium. *Cornea*. 2002;21(1):38-42.
- [5] Blodi BA, Byrne KA, Tabbara KF. Goblet cell population among patients with inactive trachoma. *Int Ophthalmol*. 1988;12(1):41-45.
- [6] Liu ZG, Zhongguo Yanerbihouke Zazhi. 2004;4(1):4-5. 刘祖国. 关于干眼名词及分类的初步建议[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2004, 4(1):4-5.
- [7] Tsubota K, Nakamori K. Effects of ocular surface area and blink rate on tear dynamics. *Arch Ophthalmol*. 1995;113(2):155-158.
- [8] Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, et al. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*. 2001;43(2):89-105.
- [9] Matsuo T. Trehalose protects corneal epithelial cells from death by drying. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(5):610-612.
- [10] Zhu Z, Stevenson D, Schechter JE, et al. Lacrimal histopathology and ocular surface disease in a rabbit model of autoimmune dacryoadenitis. *Cornea*. 2003;22(1):25-32.
- [11] Liu SC, Wu XM, Guoji Yanke Zazhi. 2009;9(7):1265-1268. 刘盛春, 吴晓梅. 减少瞬目频率建立的蒸发过强型兔干眼模型[J]. *国际眼科杂志*, 2009, 9(7):1265-1268.
- [12] Lievens CW, Connor CG, Murphy H. Comparing goblet cell densities in patients wearing disposable hydrogel contact lenses versus silicone hydrogel contact lenses in an extended-wear modality. *Eye Contact Lens*. 2003;29(4):241-244.
- [13] Abdel-Khalek LM, Williamson J, Lee WR. Morphological changes in the human conjunctival epithelium. I. In the normal elderly population. *Br J Ophthalmol*. 1978;62(11):792-799.

来自本文课题的更多信息—

利益冲突: 无其他公司赞助或利益冲突。

课题意义: 海藻糖具有保护生物细胞和活性物质在干燥等不良环境下活性不受破坏的独特生物学性质, 国外研究人员正在积极探索将其用于治疗干眼症的可行性。目前, 研究证实, 海藻糖能够有效降低角膜上皮细胞在干燥环境中的死亡率, 本研究的创新性主要体现在海藻糖有可能促进杯状细胞的增殖。

课题评估的“金标准”: 角膜荧光素钠染色与结膜印迹细胞学具有较好的相关性, 是常用于检测干眼症的评估手段。

设计或课题的偏倚与不足: 实验未选用最新的干眼模型。

提供临床借鉴的价值: 通过检测海藻糖促进结膜杯状细胞的增殖作用, 阐明海藻糖在治疗干眼中作用, 为临床治疗干眼症提供理论依据和实验依据。