

透明质酸钠预防兔眼眶软组织粘连形成的研究

赵红 韩建华 任明玉 孙丰源

Empirical study on prevention adhesion of rabbit orbital soft tissue by sodium hyaluronate

Zhao Hong, Han Jianhua, Ren Mingyu, Sun Fengyuan. Department of Orbit, Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China

Abstract Objective This study was to observe the result and mechanism of preventing postoperation adhesion after trauma of orbit tissue by sodium hyaluronate. **Methods** Twenty eyes of 10 white rabbits were included in this study. The injury was made between superior rectus and corresponding periosteum by surgery and the superior rectus and periosteum was scratched for 10 times respectively, and then the sodium hyaluronate was used topically in the left eye of each rabbit, and the normal right eyes were in control group. One week after operation, adhesion degree in injury tissue was examined by mass examination, pathologic score and immunohistochemistry stain by TGF- β . **Results** According to the Rydell-Balazes adhesion criteria, 2 eyes showed the 3 score, 5 eyes for 2 score and 4 eyes for 1 score in the experimental group, while 5 eyes for 4 score, 3 eyes for 3 score, 2 eyes for 2 score in the control group, indicating a statistically significant difference in adhesion degree between these two groups ($u = 64, P < 0.01$). Based on the Nussbaum pathological score, 1 eye presented the higher inflammation score, and 4 eyes showed the middle score in examination group. However, the highest inflammatory score was seen in the control group, showing the 4 score in 4 eyes, 3 score in 4 eyes and 2 score in 2 eyes. The number of fibroblasts in the experimental group was less than that in the control group. The result of immunohistochemistry showed that strong positive reaction was found in the sheet of the experimental group, while weakly positive reaction was in the control group. **Conclusion** Sodium hyaluronate can prevent adhesion after trauma in the rabbit orbit effectively by promoting the growth of epithelium, inhibiting the growth of fibroblast and decreasing the synthesis of collagen fibrils.

Key words sodium hyaluronate; orbital; soft tissue; tissue adhesion

摘要 目的 探讨透明质酸钠对眼眶软组织粘连的预防作用和机制。 **方法** 成年家兔 10 只, 左右眼分别为实验眼和对照眼。在上直肌与对应眼眶骨膜间人为制造创伤, 实验组在创面间涂抹透明质酸钠凝胶, 对照组不予处理。于术后 1 周内肉眼观察两组粘连情况, 行病理学评分和转化生长因子 (TGF- β) 免疫组织化学染色。 **结果** 粘连程度评分为对照组 4 分者 5 眼, 3 分者 3 眼, 2 分者 2 眼; 实验组 4 分者 0 眼, 3 分者 2 眼, 2 分者 2 眼, 1 分者 5 眼, 两组差异有统计学意义 ($u = 61.5, P < 0.01$)。炎症反应程度评分为对照组 4 分者 4 眼, 3 分者 4 眼, 2 分者 2 眼; 实验组 4 分者 0 眼, 3 分者 1 眼, 2 分者 5 眼, 1 分者 4 眼, 两组差异有统计学意义 ($u = 64, P < 0.01$)。成纤维母细胞数量实验组明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($u = 55, P < 0.01$)。TGF- β 免疫组织化学染色结果显示对照组染色呈强阳性, 实验组呈弱阳性。 **结论** 透明质酸钠可以促进内皮细胞生长, 抑制成纤维细胞生长, 减少胶原纤维的合成, 有效抑制兔眶损伤后粘连的发生。

关键词 透明质酸钠; 眼眶; 软组织; 组织粘连

分类号 R 777.5 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)04-0289-04

眼眶外伤及手术等创伤, 不可避免损伤眼眶内组织, 引起粘连形成。因眼眶内特殊结构, 粘连会造成诸多并发症, 尤其是眼外肌与周围组织粘连, 将导致眼球

运动受限、复视等, 严重影响患者视觉和生活质量。以往预防粘连的研究经历了改进手术方式、应用抗生素和糖皮质激素类药物等阶段^[1-2]。近年来可降解生物材料则成为研究热点^[3]。透明质酸钠是一种可生物降解高分子多聚糖生物材料, 本研究旨在应用透明质酸钠凝胶, 探索其在防治眼眶粘连形成的早期价值。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

健康成年家兔 10 只(由天津医科大学动物实验中心提供),体重 2.5~3.0 kg。取左眼为实验眼,右眼为对照眼。将动物常规消毒,采用氯胺酮(50 mg/kg)和氯丙嗪(25 mg/kg)肌内注射麻醉后,经上睑穹隆部结膜入路暴露上直肌及对应的骨膜,用手术刀片搔刮长度为 1 cm 的上直肌 10 次,搔刮对应的眶上壁骨膜 10 次,面积 1.0 cm × 1.0 cm。将透明质酸钠凝胶 0.2 mL 均匀涂抹于损伤面上;对照组不予任何处理。10-0 缝线固定损伤的直肌与骨膜面,缝合结膜切口。手术均由同一术者操作,术后所有眼均以磺胺醋酸钠滴眼液每日 4 次点眼,7 d 后观察两组粘连情况。

1.2 方法

1.2.1 牵拉实验及大体观察 爱尔凯因表面麻醉兔眼,于上睑穹隆部结膜处,找到并拆除固定缝线,用有齿镊夹持 6 点位置的角膜缘做主动及被动牵拉实验,并记录结果。大体标本粘连程度评分采用改良的 Yaacobi 肉眼评分标准^[4]。0 分:无粘连;1 分:粘连面积 < 20%,可钝性剥离,无出血;2 分:粘连面积 < 50%,剥离时有溢血;3 分:粘连面积 > 50%,不易剥离,出血多;4 分:几乎完全粘连,分离困难。

1.2.2 炎症反应分级 大体观察后,行眼眶内容物摘除术,取下直肌及对应的骨膜、视神经等组织常规方法制成切片,切片厚 6 μm,苏木精-伊红染色,每眼取 3 张切片任意选取 5 个高倍视野,进行炎症反应分级,采用改良的 Nussbaum 标准病理评分^[5]法。0 分:镜下未见或极少见淋巴细胞;1 分:镜下见少量淋巴细胞;2 分:镜下见嗜中性粒细胞、淋巴细胞,可见巨噬细胞;3 分:炎症反应以嗜中性粒细胞为主,可见巨噬细胞。

1.2.3 成纤维母细胞计数 随机抽取每个眼球的切片 1 张,每张切片记数 5 个高倍(400 倍)视野,运用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文系统分析做成纤维母细胞计数,取其均值,并记录结果。

1.2.4 免疫组织化学法 常规方法制作组织切片,采用卵白素-生物素-过氧化物酶复合物法对切片进行转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)染色,光镜下观察。根据细胞染色深度和着色细胞数量确定染色程度。(1)弱阳性:细胞着色为淡棕色,着色细胞散在分布;(2)阳性:细胞着色为棕色,着色细

胞量多;(3)强阳性:细胞着色为深棕色,着色细胞量多而密集。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计学软件对数据进行统计学分析。粘连程度评分、炎症反应评分、成纤维母细胞计数结果采用两组独立样本 Wilcoxon 秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察情况

大体观察发现对照组的粘连较严重,呈致密的纤维性粘连,拆线,做牵拉实验,对照组眼球几乎不能转动;而实验组的粘连呈松散状,拆线,做牵拉实验,眼球活动度明显大于对照组。采用改良的 Yaacobi 肉眼评分标准^[4]评分,对照组 4 分者 5 眼,3 分者 3 眼,2 分者 2 眼;实验组 4 分者 0 眼,3 分者 2 眼,2 分者 2 眼,1 分者 5 眼,两组之间差异有统计学意义($u = 61.5, P < 0.01$)。

2.2 病理学观察

对照组手术区骨膜有渗出,骨膜下和肌纤维之间有大量的纤维组织增生和新生血管,在纤维间可见大量的纤维母细胞,纤维排列致密,其间可见较多的淋巴细胞浸润。炎性纤维组织与骨膜和肌纤维之间粘连紧密,且仅局限于手术区(图 1)。实验组的手术区骨膜反应轻微,骨膜下有轻微的纤维组织增生,其间有少量的纤维母细胞,排列规则,纤维排列疏松,并有少量的淋巴细胞浸润。炎性纤维组织与外直肌之间无明显的粘连,可见界限比较明显的裂隙。肌纤维表面仅见少量的纤维细胞和肌外膜细胞增生(图 2)。

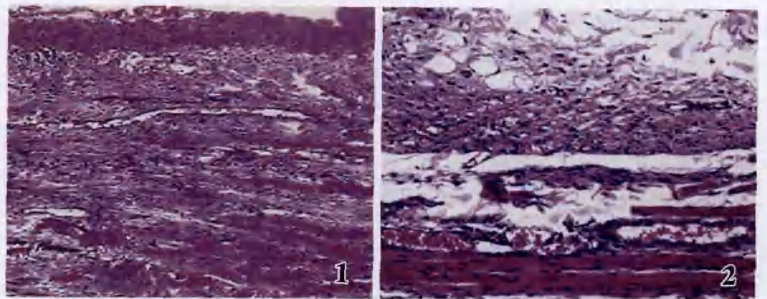


图 1 对照组骨膜下和肌纤维之间有大量的纤维组织增生和新生血管,纤维间可见大量纤维母细胞,纤维排列致密(HE × 200) **图 2** 实验组骨膜下有轻微的纤维组织增生,其间有少量的纤维母细胞,排列规则,纤维排列疏松,并有少量淋巴细胞浸润。炎性纤维组织与外直肌之间无明显粘连,可见界限比较明显的裂隙(HE × 200)

Fig. 1 Hyperplasia of fibrous tissue, new vessels are more widespread under periosteum and between muscle fiber, and lots of fibroblasts in the pyknotic fiber are seen in control group (HE × 200) **Fig. 2** Hyperplasia of fibrous tissue is slight under periosteum, and the arrangement of the fiber is regular but loosened with slight lymphocyte. The adhesion is unobvious between the inflammatory fiber tissue and the lateral rectus, with obvious bound in experimental group (HE × 200)

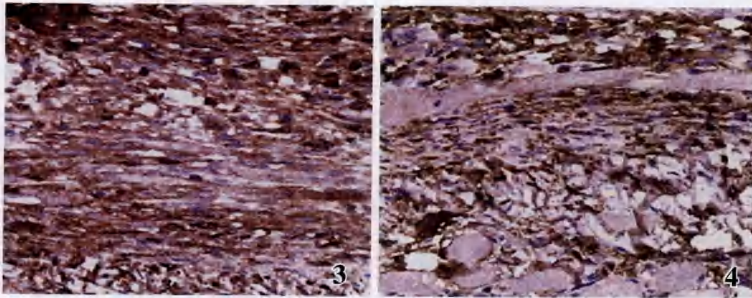


图3 对照组纤维粘连组织及炎症反应区域 TGF- β 染色呈强阳性,着色细胞数量多而密集($\times 200$) 图4 实验组纤维粘连组织及炎症反应区域 TGF- β 染色呈弱阳性,着色细胞数量少,呈散在分布($\times 200$)

Fig.3 TGF- β shows the strong mascline in the adhesion tissue and the district of inflammation;the pigmentosus cells are more and concentrate in control group ($\times 200$)

Fig.4 TGF- β presents the slight mascline in the adhesion tissue and the district of inflammation,and the pigmentosus cells are little and sporadic in experimental group ($\times 200$)

2.3 炎症反应分级

对照组 4 分者 4 眼,3 分者 4 眼,2 分者 2 眼;实验组 4 分者 0 眼,3 分者 1 眼,2 分者 5 眼,1 分者 4 眼,实验组炎症评分低于对照组,两组间差异有统计学意义($u = 64, P < 0.01$)。实验组成纤维母细胞数量明显少于对照组,两组之间差异有统计学意义($u = 55, P < 0.01$)。

2.4 免疫组织化学染色结果

对照组形成的纤维粘连组织及炎症反应区域 TGF- β 染色呈强阳性,着色细胞数量多而密集,染色呈棕褐色(图 3)。实验组 TGF- β 染色呈弱阳性,着色细胞数量少,呈散在分布,染色呈浅棕黄色(图 4)。

3 讨论

近年来,随着交通事故的增加,颜面部外伤和眼眶外伤呈增加的趋势。另外,由于医学影像学的发展,增加了眼眶肿瘤的手术机会。随之而来的由手术、外伤造成的并发症也不断增多。其中软组织之间粘连瘢痕的形成,可造成患者术后或伤后复视、眼位不正等并发症。如何预防眼眶手术及外伤后的软组织粘连成为亟待解决的问题。

透明质酸是一种高分子直链聚糖,由 N-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖醛酸二糖反复交联形成,广泛分布于人体组织,属于生物可降解吸收的高分子材料,可减少粘连的发生率和严重程度^[6-8]。临床上已有透明质酸钠用于关节腔内注射,以及腹腔术后肠粘连的预防和治疗的报道^[9-10]。本研究中,透明质酸钠凝胶涂布在组织表面 7 d 后,炎性纤维组织与外直肌之间可见界限比较明显的裂隙,表明透明质酸钠可起到隔离的作用,避免组织接触,维持受损组织有序修复;同时医用透明

质酸钠具有良好的组织相容性,可在眶内完全降解吸收,无抗原性及过敏反应。

粘连形成可看作组织的纤维化,开始于炎症反应,伴随中性粒细胞浸润到受损组织的血凝块内,随后巨噬细胞迁移,继而出现成纤维细胞及胶原沉积,导致组织发生一系列粘连的病理改变。近年来,人们更多地从分子生物学和细胞生物学的角度研究粘连形成的机制,发现在粘连形成的过程中有很多的细胞因子参与,例如:TGF- β_2 、成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子、表皮生长因子、血管内皮生长因子等。其中 TGF- β_2 与创伤愈合和瘢痕形成的关系最为密切,其活化程度与瘢痕形成高度相关^[11-13]。本实验表明实验组的炎症反应明显

轻于对照组;TGF- β_2 的表达明显低于对照组。

由于透明质酸钠可在生物修复中形成无序纤维网络结构,隔离在组织表面覆盖炎症组织,减轻局部炎症反应和炎性细胞浸润,限制浆液性渗出;既能抑制纤维细胞的运动和活性,抑制纤维蛋白的沉积,又能刺激组织间细胞的生长和分化,从而防止粘连和纤维组织的形成^[14]。

眼科应用透明质酸钠注入巩膜、结膜瓣下,防止纤维组织增生而造成滤过泡瘢痕粘连,取得较好的疗效^[15]。亦有术中球筋膜与眼外肌间隙局部灌注透明质酸钠,可以明显减轻粘连性斜视术后再粘连发生的报道^[16]。结合本实验结果可以认为透明质酸钠凝胶在防治眼眶组织粘连形成的早期效果明显且安全,操作性强,可应用与临床,但尚需要通过长期观察,进一步证实其预防局部粘连形成的价值。

参考文献

- 1 Billings E, May JW. Historical review and present status of free fat graft autotrans-plantation in plastic and reconstructive surgery [J]. *Plas Reconstr Surg*, 1989, 83: 368 - 381
- 2 Rothkopf DM, Webb S, Szabo RM, et al. An experimental model for the study of canine flexor tendon adhesions [J]. *J Hand Surg (Am)*, 1991, 16: 694 - 700
- 3 赵红, 韩建华, 林锦镛, 等. 壳聚糖膜在眼眶外伤早期修复中的作用 [J]. *中华眼科杂志*, 2008, 44(6): 554 - 557
- 4 Yaacobi Y, Hamed YM, Kaul KS, et al. Reduction of post operative adhesions secondary to strabismus surgery [J]. *Ophthalmic Surg*, 1992, 23(2): 123 - 128
- 5 Nussbaum CE, McDonald JV, Baggs RB. Use of viayl (polygliding 910) mesh to limit epidural scar formation after laminectomy [J]. *Nerosurgery*, 1990, 26: 649
- 6 Risberg B. Adhesions; preventive strategies [J]. *Eur J Surg*, 1997, 577: 32 - 39
- 7 顾其胜. 医用透明质酸钠在临床中的应用 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 1998, 12(20): 124 - 126
- 8 Larsen NE. Management of adhesion formation and soft tissue augmentation with viscoelastics; hyaluronan derivatives. // Laurent TC, ed. *The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its*

derivatives[M]. London:Portland Press,1998:267-281

9 刘荣清,李海宁,叶青山,等.透明质酸钠治疗膝骨关节炎疗效观察[J].中华风湿病学杂志,2004,8(3):155-157

10 李波,罗开元,邵庆华,等.医用透明质酸钠预防粘连性肠梗阻的疗效观察[J].中国现代医学杂志,2004,14(6):88-89

11 Mead AL, Wong TT, Cordeiro MF, et al. Evaluation of anti-TGF-beta2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2003,44(8):3394-3401

12 Liu W, Chua C, Wu X, et al. Inhibiting scar formation in rat wounds by adenovirus mediated overexpression of truncated TGF-beta receptor II [J]. Plast Reconstr Surg,2005,115(3):860-870

13 韩建华.转化生长因子-β在眼部组织创伤修复和瘢痕形成中的作用[J].天津医科大学学报,2007,13:190-193

14 Zhou J, Elson C, Lee TD. Reduction in postoperative adhesion formation and reformation after an abdominal operation with the use of N, O-carboxymethyl chitosan Nova Scotia[J]. Canada Surg,2004,135(3):307-312

15 李美玉.非穿透性小梁手术联合透明质酸钠生物胶植入术的临床疗效观察[J].中华眼科杂志,2001,37(6):404-408

16 袁建树,周雨声.透明质酸钠在粘连性斜视矫正术中应用的临床观察[J].中国斜视与小兒眼科杂志,2002,10(4):34-36

(收稿:2008-06-16 修回:2008-12-06)

(本文编辑:刘艳)

· 病例报告 ·

萎缩眼球巨大结膜植入性囊肿一例

吉红云 许龙华

患者,女,24岁,因右眼外伤后失明近20年入院。患者4岁时右眼被公鸡啄伤,继而失明,眼球外伤并萎缩变小,为改善外观到我院就诊。视力:右眼无光感,左眼0.2(-2.70DS→1.2);眼压:右眼T_{n-1},左眼13mmHg(1mmHg=0.133kPa);右眼外斜约30°,转动受限。眼睑闭合可,眼眶饱满。球结膜泡状隆起范围>3/4周,仅颞下方隆起不明显,无充血,结膜表面无色素,角膜直径<9mm,混浊变性,前房几乎消失,虹膜明显膨隆贴附于角膜内皮,瞳孔不见,余眼内结构均不可见。左眼前后节未见明显异常。B型超声检查:右眼玻璃体腔较正常缩小,球后壁回声增强,鼻侧偏后极探及强回声光斑,降低增益与球壁回声同时消失。入院诊断:(1)右眼球萎缩伴结膜囊肿;(2)左眼屈光不正。局部麻醉下行右眼I期义眼台植入术,术中探查并完整分离囊肿表面结膜,暴露出占3/4周的结膜下透明如水泡状巨大囊肿,连同眼球完整摘除,并送病理检查。病理报告:右眼球角膜上皮厚薄不均,基质胶原化,视网膜剥离伴钙盐沉着,符合眼球癆改变,并见球结膜良性衬覆上皮包含囊肿。

讨论:结膜植入性囊肿按其发病原因可分为先天性和后天性。后天性结膜囊肿较常见,包括:(1)上皮植入性结膜囊肿:结膜裂伤或手术中,将上皮细胞植入到结膜下,细胞增生,中央变性液化,形成囊腔。腔内充以透明液体或凝胶状物质,囊壁由非角化的上皮细胞和结缔组织组成。(2)上皮内生性结膜囊肿:由于结膜慢性炎症刺激,上皮细胞内陷增长,形成细胞团,中央部变性液化形成囊腔。(3)腺体滞留性结膜囊肿:由于结膜慢性炎症刺激、浸润压迫及瘢痕收缩,使结膜腺体(副泪腺)排泄口被阻塞、闭锁,腺体分泌物不能排出而滞留、淤积,形成囊肿^[1]。

眼部手术(斜视手术、玻璃体手术、翼状胬肉手术、青光眼滤过性手术等^[2])均可并发结膜囊肿,囊肿的形成也可能与缝线材料有关^[3]。治疗操作不当也可造成囊肿的形成^[4]。

上皮植入性结膜囊肿也可见于翼状胬肉,脸裂斑炎,春季

结膜炎,化脓性肉芽肿等良性结膜病变,这种类型囊肿的形成和炎性细胞的浸润有关^[5]。Lee等^[6]报道1例由春季结膜炎并发的植入性结膜囊肿行组织病理学检查,囊壁未见炎性细胞浸润,故认为睑结膜巨乳头与球结膜间的机械摩擦可能是囊肿形成的诱因。

本例患者为眼球外伤后在萎缩的眼球上形成巨大结膜植入性囊肿,使得眼眶较饱满,与单纯眼球萎缩的患者体征不同。此患者因不是以结膜囊肿首诊,且病史较长,不能确定囊肿发生的时间及发展的速度;右眼外伤失明后未就诊,可以排除手术和因素,因此外伤引起的上皮植入性结膜囊肿病因较明确。在有功能眼中,靠近角膜缘的隆起性病变如囊肿,可影响泪膜的分布,小的囊肿即可能造成干燥性角膜上皮剥脱甚至角膜小凹,从而引起不适症状^[4]。较小的囊肿无不适症状者无需治疗,有的可以自行消失,持续生长者可达角膜缘或角膜表面,引起角膜散光和视力损害^[2]。治疗可以手术切除、冷冻、烧灼、激光。本病例患者在行眼球摘除时同时完整地取出结膜囊肿,目前患者在进一步随访中。总之,上皮植入性囊肿是外伤或手术后的并发症,因此在手术或结膜伤口的缝合时要尽可能对位整齐,防止结膜内翻是预防植入性囊肿形成的关键。

参考文献

1 刘家琦,李凤鸣,主编.实用眼科学[M].第2版.人民卫生出版社,2005:311

2 Kothari MT, Jain S, Kothari KJ. Giant inclusion cyst of the cornea following filtering surgery[J]. Indian J Ophthalmol,2006,54(2):117-118

3 Dadeya S, Ms K. Strabismus surgery: fibrin glue versus vicryl for conjunctival closure[J]. Acta Ophthalmol Scand,2001,79:515-517

4 Vish wanath MR, Jain A. Conjunctival inclusion cyst following sub-Tenon's local anaesthetic injection[J]. Br J Anaesth,2005,95(6):825-826

5 Suzuki K, Okisaka S, Nakagami T. The contribution of inflammatory cell infiltration to conjunctival inclusion cyst formation[J]. Jpn J Ophthalmol, 2000,44(5):575

6 Lee SW, Lee SC, Jin KH. Conjunctival inclusion cysts in long-standing chronic vernal keratoconjunctivitis [J]. Korean J Ophthalmol, 2007, 21(4):251-254

(收稿:2008-10-22)

(本文编辑:尹卫靖)