

眼外肌局部注射 IGF- I 的组织学变化

许金玲 余新平 陈洁 张芳 余焕云 高军

Histology of extraocular muscle after direct injection of insulin-like growth factor- I

Xu Jinling, Yu Xinping, Chen Jie, Zhang Fang, Yu Huanyun, Gao Jun. Eye Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China

Abstract Objective Insulin-like growth factor (IGF) is verified to promote the proliferation of skeletal muscle and repairing of injury of skeletal muscle. Research showed that the contraction ability of extraocular muscle is enhanced following the topical injection of IGF- I. This study was to evaluate the histology change of extraocular muscle after direct injection of IGF- I.

Methods The superior rectus muscle from lateral eyes in 7 normal adult rabbits received a single-time injection of 10 μg (0.05 mL) IGF- I, and the superior rectus muscle from fellow eye received an injection of 0.05 mL saline only. One week after injection, the morphology of the muscle both in IGF treated and control muscles was studied under the light microscope, and the activated satellite cells in superior rectus muscle were determined by immunohistochemistry.

Results No obvious infiltration of inflammatory cells was seen in the muscles after injection. The perimeter of the orbital layer fibers in the superior rectus muscle was (120.24 + 30.76) μm in IGF- I injection group and (108.48 + 25.64) μm in control group, showing a significant difference between them ($P = 0.000$). The perimeter of the global layer fibers in the superior rectus muscle was (178.99 \pm 58.63) μm in IGF- I injection group compared with control group (184.80 \pm 55.59) μm without significant difference between them ($P = 0.127$). The frequencies of large and small fibers in the muscles were more in IGF- I injection group than that in control muscles ($P = 0.033$). The frequencies of activated satellite cells of both global and orbital layer in the muscles were more in IGF- I injection group than those in control group ($P = 0.000$). **Conclusion** Direct injection of IGF- I into extrocular muscles is an effective and safe procedure. IGF- I promotes the proliferation of extraocular muscle fibers and activates the satellite cells, but the response of global and orbital layer muscle fibers to IGF- I may be different.

Key words extraocular muscle; insulin-like growth factor- I; satellite cells

摘要 目的 探讨局部注射胰岛素样生长因子 I (IGF- I) 后眼外肌组织学变化, 评估局部用药对眼部组织的安全性。**方法** 7 只成年新西兰大白兔, 双眼上直肌随机注射 0.05 mL (10 μg) IGF- I 或 0.05 mL 生理盐水, 1 周后获取上直肌行组织病理学检查。**结果** 实验组和对照组眼球巩膜及色素膜未见明显炎性细胞浸润; 实验组眶层纤维周径 (120.24 \pm 30.76) μm 与对照组 (108.48 \pm 25.64) μm 比较差异有统计学意义 ($t = 6.734, P = 0.000$)。2 组球层眼外肌纤维周径差异无统计学意义 ($t = 1.527, P = 0.127$)。实验组的球层和眶层纤维大细胞和小细胞的比例与对照组差异有统计学意义。实验组球层和眶层眼外肌活化卫星细胞的比例较对照组均显著提高; 2 组眼外肌球层肌纤维的活化卫星细胞比例较眶层显著提高。**结论** 局部注射 10 μg IGF- I 对眼部组织无明显不良反应, 局部应用对眼外肌和眼球是安全的。IGF- I 能使眼外肌纤维快速增生, 激活肌卫星细胞。球层和眶层眼外肌纤维对 IGF- I 的反应可能有所不同。

关键词 眼外肌; 胰岛素样生长因子 I; 卫星细胞

分类号 R 777.4 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)06-0477-04

胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)

能提高骨骼肌肌力、促进骨骼肌增生、加速受损骨骼肌的恢复, 目前已在运动医学领域广泛研究^[1-2]。眼外肌为一特殊的骨骼肌, 肌纤维构成和组织学特点与一般骨骼肌有很大不同^[3]。研究发现眼外肌局部注射 IGF- I 后短时间即能显著提高肌肉收缩力^[1]。本研究

本课题为温州医学院眼视光学院科研启动经费 (KYQD070402)、浙江省教育厅科研项目 (20070995) 资助

作者单位: 325027 温州医学院附属眼视光医院

通讯作者: 余新平 (Email: yu-xinping@163.com)

探讨眼外肌局部注射 IGF 后的组织学变化及对眼外肌的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年新西兰大白兔 7 只(温州医学院动物实验中心提供),雌雄不限,体重 2.0 ~ 2.5 kg;臀大肌肌内注射氯胺酮(10 mg/kg)和甲苯氯嗪(2 mg/kg)麻醉,任意选择一侧眼为实验眼,IGF-I(美国 Peprtech 公司)10 μg 以无菌生理盐水稀释为 0.05 mL 肌内注射入实验眼上直肌肌腹,距肌止端 8.0 ~ 10.0 mm;同时将 0.05 mL 无菌生理盐水注射入对侧眼上直肌作为对照组,每次注射时均用量尺测量、记录注射点距肌止端的距离,尽量保持一致的距离。术后立即结膜囊点硫酸新霉素滴眼液 1 次,5 min 后再点 1 次。

1.2 方法

1.2.1 组织病理学和免疫组织化学研究

动物处死后获取全段眼外肌,将眼外肌分为注射点段和中间肌腹部段,分别连续冰冻切片,切片厚度为 10 μm。注射点段眼外肌切片行苏木精 - 伊红染色,观察实验组和对照组肌纤维情况和炎性细胞浸润情况;肌腹部段眼外肌行苏木精 - 伊红染色、MYOD1 免疫组织化学染色。MYOD1 免疫组织化学染色采用 SABC 法,一抗为鼠抗兔 MYOD1 单克隆抗体(美国 Chemicon 公司),浓度为 1:50。冰冻切片以山羊血清封闭,滴加一抗,4 °C 过夜后 37 °C 复温 45 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗,滴加生物素标记的山羊抗小鼠二抗(武汉博士德公司),PBS 冲洗, DAB 显色,常规脱水、封闭。400 倍镜下计算阳性细胞和肌纤维数量的比例,要求计算 4 个以上视野或肌纤维数大于 500 个。MYOD 阳性的位于肌纤维肌膜下的细胞认为是活化的卫星细胞^[4-5](图 1)。

1.2.2 肌纤维周径测量 采用 DT2000 图像分析软件 2.0(南京东图数码科技有限公司)测量高倍镜下眶层和球层肌纤维横截面的周径,每个切片测量 100 ~ 200 个肌纤维。纤维周径 ≥ 200 μm 的细胞为大细胞, < 100 μm 者为小细胞,100 ~ 200 μm 者为中等细胞。

1.2.3 炎症反应情况观察 获取眼球,标记注药部位的相应巩膜,肉眼和显微镜下观察实验眼和对照眼巩膜表面是否有明显区别;10% 甲醛液固定,切片行苏木精 - 伊红染色,观察巩膜和色素膜炎性细胞浸润情况。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学分析,实验组和对照组平均肌纤维周径比较采用配对 *t* 检验,实验组和对照组的活化卫星细胞比例、不同类型细胞的比例采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 炎症反应情况

实验组和对照组眼球巩膜表面无明显异常,表面筋膜充血情况无明显差别;2 组眼球切片苏木精 - 伊红染色巩膜均无明显炎性细胞浸润。2 组眼外肌在注射点段的苏木精 - 伊红染色见肌纤维排列整齐、边界清晰,未见明显坏死和炎性细胞浸润(图 2)。

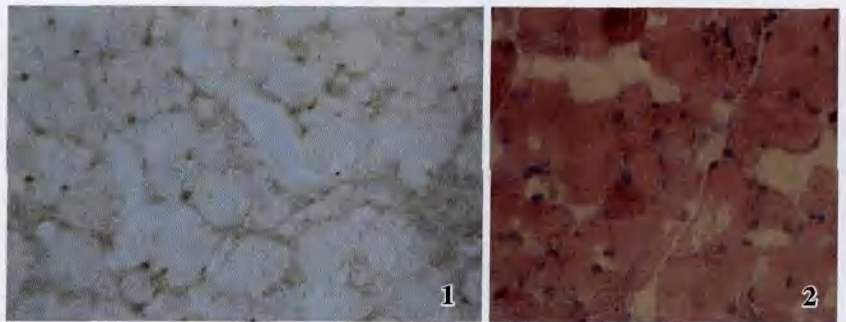


图 1 实验组眼外肌 MYOD 染色阳性,活化的卫星细胞并位于肌纤维膜肌纤维膜下(×400) 图 2 实验组肌纤维排列整齐,未见明显坏死和炎性细胞浸润,可见周径极大的肌纤维和极小的肌纤维(HE ×400)

Fig.1 Activated satellite cells under the epimysium show the positive staining for MYOD (×400) Fig.2 No significant necrosis and infiltration of inflammatory cells are found in the study group, and tremendous perimeter of muscle fibers and small muscle fibers can be seen(HE ×400)

2.2 肌纤维周径及大小细胞比例

实验组和对照组球层肌纤维周径差异无统计学意义($t = 1.527, P = 0.127$),实验组眶层纤维周径比对照组明显增大($t = 6.734, P = 0.000$)(表 1)。实验组球层纤维中大细胞和小细胞的比例增多,与对照组差异有统计学意义($\chi^2 = 6.830, P = 0.033$),眶层纤维中大细胞和中等细胞较对照组比例高,小细胞比例低,差异有统计学意义($\chi^2 = 36.400, P = 0.000$)(表 2)。

2.3 活化卫星细胞情况

实验组球层纤维中活化卫星细胞为 35%,眶层纤维中活化卫星细胞为 27.44%,差异有统计学意义($\chi^2 = 18.680, P = 0.000$);对照组球层纤维中活化卫星细胞为 17.97%,眶层纤维中活化卫星细胞为 13.18%,差异有统计学意义($\chi^2 = 17.780, P = 0.000$)。实验组球层和眶层纤维的活化卫星细胞比对照组高,差异有统计学意义($\chi^2 = 209.123.1, P = 0.000$)(表 3)。

表 1 2 组肌纤维周径的比较 (μm)

Table 1 Perimeter of global layer fibers and orbital layer fibers in two groups(μm)

Group	Global layer fibers	Orbital layer fibers
IGF- I injection	178. 99 ± 58. 63	120. 24 ± 30. 76
Control	184. 80 ± 55. 59	108. 48 ± 25. 64
t	1. 527	6. 734
P	0. 127	0. 000

(Paired t-test)

表 2 2 组肌纤维大中小细胞数量比较

Table 2 Number of large, middle and small fibers in two group

Control	Global layer fibers			Orbital layer fibers		
	Large	Middle	Small	Large	Middle	Small
IGF- I injection	169	281	25	16	444	161
Control	141	280	161	2	268	196
χ ²	6. 830			36. 400		
P	0. 033			0. 000		

(χ² test)

表 3 2 组中活化卫星细胞数比较 [n/N(%)]

Table 3 Activated satellite cells of global layer and orbital layer fibers in two groups [n/N(%)]

Group	Global layer fibers	Orbital layer fibers	χ ²	P
IGF-I injection	1 215/3 471 (35)	733/2 675 (27. 44)	18. 680	0. 000
Control	445/2 480 (17. 97)	239/1 814 (13. 18)	17. 780	0. 000
χ ²	209. 000	123. 100		
P	0. 000	0. 000		

(χ² test)

3 讨论

IGF 包括 IGF- I 和 IGF- II 2 种, 其能显著提高骨骼肌的肌肉收缩力量, 促进肌肉增生^[1]。动物实验发现, 反复多次骨骼肌局部注射 IGF 可导致炎症反应, 从而降低其效用^[6]。本研究发现眼外肌单次注射 IGF- I 后无明显炎性细胞浸润, 未见眼外肌肌纤维变性、坏死等毒性反应。注射部位附近的巩膜和相应的色素膜也未见明显炎性变化。证实局部注射 IGF- I 对眼外肌和眼球也无明显毒性反应和炎性变化。

IGF 对肌肉的作用机制为通过有丝分裂激活的蛋白激酶介导肌卫星细胞增生和通过磷脂酰肌醇-3 激酶介导的信号促进肌纤维蛋白合成和葡萄糖摄取^[1]。本研究发现眶层眼外肌肌纤维增大明显, 其大细胞和中等大小细胞比例较对照组显著提高; 而球层眼外肌肌纤维中大细胞和小细胞的比例均增多。既往研究发现眼外肌局部注射 IGF- I 后肌纤维横截面积更大; 而注射 IGF- II 后眼外肌肌纤维的横截面积与对照组比较, 差异无统计学意义, 但大纤维和小纤维的比例更大^[7-8]。McLoon 等^[7]认为小纤维的增多也是用药后

肌纤维增生的一种表现。本研究发现球层和眶层肌纤维的增生特点有不同, 提示眼外肌的球层和眶层对 IGF- I 的反应有所不同。

组织学研究发现功能亢进的下斜肌及缩短术后的内直肌中活化卫星细胞的比例增多, 眼外肌中活化卫星细胞的增多可能与肌肉力量增加有关^[4-5]。成年猴和人眼外肌中活化卫星细胞为 2% ~ 4%^[9], 成年新西兰大白兔眼外肌中的活化卫星细胞为 3% ~ 4%^[5]。肌肉创伤、牵拉和眼外肌缩短术均能激活卫星细胞, 使眼外肌中活化卫星细胞数量增多^[9], 既往关于 IGF 对眼外肌作用的研究未探讨注药后眼外肌卫星细胞的变化^[7-8], 本实验中对照组注射生理盐水后的创伤反应也可促进卫星细胞活化, 但实验组的活化卫星细胞比例较对照组明显增加, 提示 IGF- I 能明显促进眼外肌卫星细胞活化。既往研究发现正常成年猴和人的眼外肌中眶层和球层肌纤维中的活化卫星细胞比例差异无统计学意义^[9], 本研究发现 IGF- I 注射后球层和眶层肌纤维中活化卫星细胞比例差异有统计学意义, 提示 IGF- I 及创伤等因素对眼外肌眶层和球层卫星细胞的激活作用不同。

本研究发现局部注射 10 μg 的 IGF- I 对眼外肌及眼球无明显毒性作用, 无明显致炎性, 局部应用对眼外肌和眼球是安全的。IGF- I 能使眼外肌肌纤维快速增生, 激活肌卫星细胞。球层和眶层眼外肌肌纤维对 IGF 的反应可能有所不同。而活化的卫星细胞的转归及其对眼外肌的确切作用尚需进一步研究。

参考文献

- Singleton JR, Feldman EL. Insulin-like growth factor- I in muscle metabolism and myotherapies [J]. Neurobiol Disease, 2001, 8(4): 541 - 554
- 李云霞, 陈世益. 胰岛素样生长因子与骨骼肌再生 [J]. 中华创伤外科杂志, 2001, 17(11): 701 - 703
- Porter JD, Baker RS, Ragusa RJ, et al. Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function [J]. Surv Ophthalmol, 1995, 39, 6: 451 - 484
- Antunes-Foschini RMS, Ramalho FS, Ramalho LN, et al. Increased frequency of activated satellite cells in overacting oblique muscles from humans [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47: 3360 - 3365
- Christiansen SP, McLoon LK. The effect of resection on satellite cell activity in rabbit extraocular muscle [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47: 605 - 613
- 卫宏图, 陈世益, 李云霞, 等. 转人类胰岛素样生长因子- I 基因成肌细胞对骨骼肌急性钝挫伤后 II b 型肌球蛋白重链及波形蛋白 mRNA 表达的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2005, 24(3): 268 - 272
- McLoon LK, Christiansen SP. Increasing extraocular muscle strength with insulin-like growth factor II [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(9): 3866 - 3872
- Anderson BC, Christiansen SP, Grandt S, et al. Increased extraocular muscle strength with direct injection of insulin-like growth factor- I [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47: 2461 - 2467
- McLoon LK, Wirtschafter J. Activated satellite cells in extraocular muscles

of normal adult monkeys and humans [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44: 1927 - 1932

(收稿:2008-06-27 修回:2009-03-16)

(本文编辑:高红)

· 临床经验 ·

准分子激光上皮下角膜磨镶术后角膜上皮愈合延迟的原因分析

史芳荣 刘洛如

近年来,准分子激光上皮下角膜磨镶术(LASEK)治疗屈光不正,获得满意疗效,但术后发生上皮愈合延迟的防治,报道甚少。上皮愈合延迟是指屈光手术3d后,角膜上皮持续或反复出现上皮剥脱而形成的缺损状态^[1],不仅使患者感到不适,影响视力恢复,同时也导致haze的发生率明显增高。现将LASEK术后发生的上皮愈合延迟的原因,分析如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2007年12月—2008年5月在我院准分子中心就诊并行LASEK的屈光不正患者65例(130眼);年龄18~40岁;屈光度-1.50~-6.50D。根据Schimer试验和泪膜破裂时间(BUT)等术前检查结果将患者分为2组。A组23例(46眼),Schimer值为8~12mm,BUT值为6~10s;B组42例(84眼),Schimer值≥12mm,且BUT≥10s。

1.2 手术方法 所有患者均签署知情同意书。均采用20%乙醇浸润角膜20s,制作角膜上皮瓣,采用美国博士伦217 Z-100准分子激光治疗仪进行激光治疗,标准化LASEK程序顺利完成手术。所有患者术前3d及术后1周,给予盐酸左氧氟沙星滴眼液抗感染治疗,术后给予氟米龙滴眼液、玻璃酸钠滴眼液点眼4~8周。

1.3 统计学方法 采用SPSS 10.0统计学软件进行统计学分析。组间术后角膜上皮愈合延迟的发生率比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 上皮愈合延迟的发生率 术后7例(10眼)发生角膜上皮愈合延迟。其中A组5例(8眼),占17.39%;B组2例(2眼),占2.38%,2组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 上皮愈合延迟的临床表现 上皮愈合迟缓多发生在术后1~12周。多数患者表现为畏光、流泪、异物感、视力下降,3眼出现睫状充血,裂隙灯检查发现角膜上皮点片状缺损、中央上皮岛、片状剥脱、水肿、haze的形成等,角膜荧光素染色阳性,多发生在角膜中央偏下方。

2.3 治疗及预后 延迟摘取角膜接触镜时间,同时给予重组人表皮生长因子滴眼液、新泪然滴眼液、卡波姆凝胶点眼,停用或间断使用氟米龙滴眼液,包扎双眼,建立人工湿房。5例(10眼)治疗后2~3周治愈,角膜上皮完整光滑,视力无影响,haze I级。2例(4眼)多次复发,经重复治疗后痊愈,haze II级和III级,病程长达3个月。

3 讨论

研究表明,PRK术后泪液中纤溶酶原激活物可作为判断角膜愈合的一个指征,术后3d持续低水平的纤溶酶原激活物水平与haze的发生相关^[2]。PRK术后,泪液中可溶性脂肪酸合成酶及其配体系统的释放会增加^[3], α -TNP的浓度也会上升^[4],对于干眼严重的患者来说,上述促进角膜愈合的因子无疑也会缺乏,从而引起角膜上皮愈合延迟。发生角膜上皮愈合延迟的原因可能与下列因素有关:(1)泪液异常;(2)基底膜与前弹力层结合异常;(3)上皮细胞异常增生或变性。该病变多见于干眼症、药物毒性角膜炎、神经营养性角膜炎和病毒感染等。此外,近年来研究发现,部分眼科手术可影响术眼泪膜的正常生理功能,而泪膜异常是导致干眼、角膜并发症等眼科疾病的主要原因^[5]。本研究中LASEK术后角膜上皮愈合延迟的发生率为7.7%,其中Schimer值和BUT值轻度异常者为17.38%,严重异常者为2.38%。说明泪膜功能与角膜上皮愈合延迟的发生有密切的关系,与刘丽铭等^[6]的研究结果吻合。故术前及术后干眼可能成为LASEK术后发生角膜上皮愈合延迟的主要诱因。同时,LASEK手术时,上皮基底细胞、基底膜和前弹力膜的损伤和缺失导致上皮基底膜灶性脱离,伴随瞬目运动眼睑切力的影响,脱离区角膜表面紊乱,导致反复上皮剥脱,也可引起上皮愈合延迟。

针对上述原因,本研究严格筛选LASEK手术适应证,排除泪液功能异常和干眼患者,并且严格遵守手术流程,还要考虑到患者的职业、年龄、所处的环境、是否长期配戴角膜接触镜等流行病学特征的影响。同时提高术中上皮瓣制作的存活率,经过多种措施并举,目前角膜上皮愈合迟缓的发生明显减少。

参考文献

- 孙秉基,徐锦堂.角膜病的理论基础与临床[M].北京:科学技术文献出版社,1994:215
- Csutak A, Tozser J, Beksi L, et al. Plasminogen activator activity in tears after excimer laser photorefractive keratectomy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 12: 3743 - 3747
- Tuominen I, Vesduoma M, Teppo AM, et al. Soluble Fas and Fas ligand in human tear fluid after photorefractive keratectomy [J]. Br J Ophthalmol, 1999, 12: 1360 - 1363
- Vesaluoma M, Teppo AM, Gronhagen-Riska C, et al. Increased release of tumour necrosis factor-alpha in human tear fluid after excimer laser induced corneal wound [J]. Br J Ophthalmol, 1997, 2: 145 - 149
- Yu EY, Jeung A, Rao S, et al. Effect of laser in situ keratomileusis on tear stability [J]. Ophthalmology, 2000, 107 (12): 2131 - 2135
- 刘丽铭,吕帆,瞿佳,等. PRK前后泪膜稳定性的比较 [J]. 眼视光学杂志, 2001, 3(1): 5 - 7

(收稿:2009-02-22)

(本文编辑:尹卫靖)