

TNF- α 和 VEGF 在羊膜移植 治疗兔眼碱烧伤中的表达

孔丽萍 吴剑波

【摘要】 目的 研究羊膜移植术在不同手术时期用不同的羊膜治疗兔眼表碱烧伤过程中肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 表达形式。**方法** 建立 32 只健康实验兔碱烧伤模型, 随机分急性期新鲜羊膜移植组、急性期保存羊膜移植组、恢复期新鲜羊膜移植组和恢复期保存羊膜移植组, 各组在术后 4w 取出眼房水、角膜, 做肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和血管生长因子 (VEGF) 的测定。**结果** TNF- α 和 VEGF 在新鲜羊膜移植组的表达明显低于保存羊膜移植组, 急性期手术组的表达也低于恢复期手术。**结论** 新鲜羊膜具有抑制角膜肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达。碱烧伤急性期较恢复期行羊膜移植有效。

【关键词】 羊膜移植术; 碱烧伤; 肿瘤坏死因子; 血管内皮生长因子

近年来, 羊膜移植治疗眼碱烧伤的报道逐渐增多, 有成功的也有失败的。为了了解眼碱烧伤在伤后何时间采用何种手术方法能取得较好的疗效, 我们建立了活体兔眼碱烧伤的模型, 并应用新鲜或保存的羊膜在不同阶段进行手术治疗, 术后 4w 取下角膜和房水给予组织免疫学检查, 现将结果报道如下并对相关问题进行讨论。

资料和方法

1. 实验对象 32 只成年新西兰大白兔, (2.2 ~ 3.0) kg, 雌雄不拘, 由温州医学院动物研究所提供, 检查无眼疾, 随机分 4 组, 每组 8 只。所有兔均右眼用来制备碱烧伤模型。A 组在急性期 (烧伤后 1w 内) 行新鲜羊膜移植术; B 组在急性期行保存羊膜移植术; C 组在恢复期 (烧伤后 2 周) 行新鲜羊膜移植术; D 组在恢复期行保存羊膜移植术。

2. 实验方法

(1) 羊膜的取材与保存 所有羊膜均取自健康剖腹产妇产的胎盘。先用无菌生理盐水冲洗羊膜组织, 然后放入含有抗生素 (50 μ g/mL 青霉素, 50 μ g/mL 链霉素, 100 μ g/mL 新霉素和 2.5 μ g/mL 两性霉素 B) 的无菌生理盐水中浸泡 10min, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内保存, 12h 内用于手术, 此为新鲜羊膜。将已处理的羊膜放在无水甘油内, 在 -25 $^{\circ}$ C 冰箱内保存, 此为

保存羊膜, 在 1m 内用于手术。

(2) 兔碱烧伤模型制作 0.5% 地卡因表面麻醉, 置开睑器充分暴露眼表, 将浸有 1.5mol/L NaOH 液的 16mm 圆形滤纸片置于角膜表面, 1min 取下, 用 30mL 生理盐水彻底冲洗眼表面, 滴妥布霉素滴眼液和涂迪克罗眼膏。

(3) 手术方法 以肌肉注射氯胺酮 (500mg/kg · b.w.) + 氯丙嗪 (25mg/kg · b.w.) 麻醉实验兔, 麻醉成功后, 开睑器充分暴露眼表, 角膜缘后 2mm 环行剪开球结膜, 并向后级部分离。将羊膜上皮面朝上平铺于眼表, 在角膜缘后 (3-4) mm 处用 10-0 无损伤缝线间断固定于巩膜浅层, 剪去多余的羊膜组织。再将球结膜游离缘被覆在羊膜上, 用 8-0 可吸收缝线固定于巩膜浅层。术后托百士眼药一日三次点眼。

(4) 动物眼的取材与免疫学检查 于术后 4w 处死实验兔, 抽取房水做肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的测定。测定的具体方法如下: 应用双抗体夹心 ABC-ELISA 法, 以自动酶标仪 492nm 波长检测, 并绘制标准曲线求出兔房水 TNF- α 浓度 (兔 TNF- α 定量 ELISA 试剂盒购自上海森雄公司)。取下羊膜移植术后 4 周的角膜组织, 做 VEGF 测定。常规石蜡包埋, 垂直于角膜表面连续切片, 厚约 5 μ m。免疫组织化学染色 (由北京技术有限公司提供的 SP 试剂盒) 具体方法如下: 石蜡切片, 0.3% 过氧化氢孵育 30min, PBS 浸泡, 加入 10% 正常山羊血清 (PBS 稀释) 10min, 加入 VEGF (1: 30) 一抗, PBS 冲洗, 滴加广谱生物素标记的二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育, ABC 显色剂

显色,复染,封片。染色结果分 5 级:一级:细胞和细胞介质不着色;+级:标本内大多数细胞可疑阳性;++级:标本内大部分阳性细胞清楚可辨;+++级:细胞染色典型,呈鲜艳的棕色;++++级:超过 10%阳性细胞染色呈棕黑色。

5. 统计学处理:数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异采用两样本均数 t 检验。

结 果

1. 角膜 VEGF 检测结果 VEGF 蛋白在角膜上皮层、基质层、内皮层内的炎症细胞胞浆里有不同的表达。4 个试验组中, A 组(急性期新鲜羊膜移植组)在三层内的 VEGF 表达最低,而 D 组(恢复期保存羊膜移植组)在三层内的 VEGF 表达最高。其中 A 组与 D 组、A 组与 C 组比较差异均有非常显著性意义 ($p < 0.001$), A 组与 B 组、C 组与 D 组间比较有显著性差异 ($p < 0.05$), 而 B 组与 C 组间比较无显著意义 ($p > 0.05$)。VEGF 在不同组不同角膜层次的表达情况见表 1。

表 1 各角膜各层中 VEGF 的表达

组别	上皮层	实质层	内皮层
A	+	+	--+
B	++	++	+~++
C	+++~++++	+++	++
D	+++	++++	++++

2. 房水内 TNF- α 的测定结果 A 组房水中 TNF- α 平均值最低,而 D 组房水中 TNF- α 平均值最高。4 组之间房水 TNF- α 含量相互比较在统计学上有差异。其中 A 组与 D 组比较差异有统计学意义 ($p < 0.001$); A 组与 C 组比较差异也有统计学意义 ($p < 0.002$); A 组与 B 组、C 组与 D 组间比较差异有统计学意义 ($p < 0.05$), 而 B 组与 C 组间比较无显著意义 ($p > 0.05$)。4 组各 8 只眼房水中 TNF- α 平均值见表 2。

表 2 各组房水中 TNF- α 的平均值

($\bar{x} \pm s, n=5.90 \times 10^6 \cdot L^{-1}$)

	A	B	C	D
TNF- α	70.31 ± 24.56	115.62 ± 18.09	114.30 ± 16.75	203.40 ± 19.11

讨 论

眼前碱烧伤后由于房水屏障的破坏,大量炎症细胞侵入前房,可以引起眼前节一系列炎症反应。细胞因子 TNF- α 是天然免疫和特异性免疫的重要介质,又是特异性炎症和免疫反应间联系的重要因子。碱烧伤后期在房水中的水平与眼内炎症反应的严重程度有

密切的关系。有学者研究^[1],碱烧伤后大量炎症细胞侵入前房,房水中 TNF- α 含量 4 小时急剧升高,24 小时达到高峰,48 小时后维持在较高水平,7-14 天后房水中的单核细胞达到高峰,活化的单核细胞分泌大量的 TNF- α ,加重眼内的炎症反应。因此对细胞因子的分泌进行有效的调控,对眼前段碱烧伤的治疗具有重要的临床意义。本试验提示,在碱烧伤急性期手术组和新鲜羊膜移植组兔眼房水中 TNF- α 的含量明显比碱烧伤恢复组和保存羊膜移植组要低。

正常人或动物角膜透明无血管,角膜新生血管是与角膜化学伤密切相关的病理现象。VEGF 是目前新确定的一种最直接的眼球内新生血管形成因子,能特异性刺激血管内皮细胞增殖及新生血管形成^[2]。VEGF 的生物学效应取决于 VEGF 的表达,而它的表达被认为与白细胞趋化作用有关,在本文观察中发现 VEGF 大量表达于炎症细胞的胞浆中,当采用新鲜羊膜移植或急性期手术治疗时,白细胞浸润和 VEGF 水平下降。

根据大量的实验研究和临床观察, Hughes^[3]将碱烧伤的组织病理过程分为三期:急性期——从接触碱性物资至伤后一周。此期的主要病理改变是组织缺血水肿和广泛坏死。恢复期——大约在伤后 1~2 周。此期的组织学的变化是各层眼组织逐渐进入再生修复期。并发病期——此期为时最久。它是一个组织再生和溃疡加深扩大交错的病理生理过程。目前,我们在临床实践中也发现,早期对碱烧伤的病人行手术治疗,可取得可喜的治疗效果。本试验结果也再次证明不管采用新鲜或保存的羊膜,在碱烧伤的急性期手术兔角膜内 VEGF 和房水内 TNF- α 的含量均比在恢复期手术要低。

近年的临床研究证实,羊膜具有抑制炎症的作用,羊膜基质能促进白细胞凋亡而消除炎症,羊膜上皮细胞能分泌的细胞因子能减少炎性介质的产生及抑制其活化,促进上皮生长并抑制新生血管形成^[4]。而保存的羊膜上皮细胞已经灭活,内含的各种活性成分可能出现效价衰减^[5]。本实验的数据显示,采用新鲜羊膜移植组兔眼房水中 TNF- α 的含量比采用保存羊膜移植手术组的含量低,而角膜血管生长因子在角膜内的表达也明显降低。此两组间的数据有显著的统计学意义。因此,我们有理由认为:采用新鲜羊膜治疗眼碱烧伤比采用保存羊膜有更好的治疗效果。

结 论

通过对 VEGF、TNF- α 在本试验中含量的测

定,我们得出以下结论:1.在碱烧伤急性期行羊膜移植手术比恢复期手术要有效。2.对碱烧伤的病人选择新鲜羊膜移植比选择保存羊膜移植要有效。

参 考 文 献

- 1 黄伟奇, 陈东, 林翔. 角膜碱烧伤房水炎性细胞因子变化的实验研究[J]. 眼外伤职业眼病杂志 2003; 25 (10): 654-655
- 2 Oh H, Takagi H, Otani A, et al. Selective induction of neuropilin1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): a mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(1): 383-388

- 3 孙为荣主编, 眼科病理学(碱烧伤部分)
- 4 Kobayashi N, Kabuyama Y, Sasaki S. Suppression of corneal neovascularization by culture supernatant of human amniotic cells [J]. Cornea 2002; 21(1): 62-67
- 5 陈剑, 丁琦, 徐锦堂, 吴静, 王彦平. 新鲜羊膜术治疗急性性角膜碱烧伤的组织病理与超微机构观察[J]. 眼科新进展, 2001; 21 (1): 15-16

(收稿时间: 2006-09)

· 病例报告 ·

额肌瓣悬吊治疗重度上睑下垂 42 例分析

马俊 徐学东

上睑下垂是眼部较常见的畸形,因上睑部分或全部遮挡瞳孔,既影响美观,又影响视觉功能,固主张尽早手术。1998年起,我科采用额肌瓣悬吊治疗重度上睑下垂 42 例,取得满意效果,现报告如下:

临床资料: 本组 42 例,其中男 30 例,女 12 例,年龄 3 岁~46 岁,单侧下垂 33 例,双侧下垂 9 例,均为重度上睑下垂,提上睑肌肌力在 4mm 以下。

手术方法:

(1)若儿童即给予氯氨酮静脉复合麻醉加局部浸润麻醉,成人局部浸润麻醉。

(2)按重睑成形术在距睑缘(5~6)mm处切开上睑皮肤,剪除切口下一条眼轮匝肌,于眼轮匝肌下向上睑剥离达眉下缘水平,在眼轮匝肌与额肌交界处切开额肌,在额肌下向眉上剥离,达眉上 2cm,宽约 1.5cm,在额部下剥离同样大小范围,形成 1.5cm × 2.0cm 大小额肌筋膜瓣,将此筋膜瓣两端用 0/1 丝线水平褥式缝合 2 针,做牵引线牵拉,将额肌筋膜瓣于眼轮匝肌深面牵拉至睑板上缘水平,根据其松紧程度,纵向劈开额肌筋膜瓣中央下端约(5~8)mm,用 0/3 丝线将额肌筋膜瓣与睑板上缘缝合 3 针,观察上睑抬高高度达角膜上缘水平,0/5 丝线间断缝合重睑切口,术后涂红霉素眼膏,局部加压包扎。

结果:

42 例重度上睑下垂患者,满意 40 例,满意率 95.2%。平视上睑缘位于角膜上缘下 1~2mm,重睑形态自然美观。2 例不满意,上睑缘位于瞳孔上缘水平。一年后,再次修复,效果满意。

讨论:

一、额肌组织瓣其蒂阔而具有神经支配和血供丰富,是一个有活力的组织瓣,保持了额肌的收缩功能,所以术后提睑活动或作用可靠而持久,而且额肌经剥离形成组织瓣与上

睑缝合固定后较在原位动度增加,术后患者睁眼时无明显抬眉皱额现象,外形美观自然^[1]。采用此方法治疗重度上睑下垂效果满意^[2]。

二、儿童先天性重度上睑下垂于全麻下施术时对眼睑高度的判断较为困难。在全麻下,双眼均呈 10 度之外展和轻度上转位^[3],也就是说全麻术中牵拉眼睑达角膜上缘水平时,较比清醒状态下要高 1mm 左右,所以术中制作额肌瓣悬吊上睑时,上睑缘应位于角膜上缘或角膜上缘下 1mm 水平,而不是位于角膜上 1~2mm,这样形成的重睑上睑缘不至于过高而矫正过正。

三、额肌筋膜瓣比较薄弱,术中剥离筋膜瓣时动作一定要轻柔,避免剥破筋膜瓣。牵拉额肌筋膜瓣时,用两根 0/1 丝线水平褥式缝合筋膜瓣两端做牵引线,避免用止血钳夹筋膜瓣,尽量减少对筋膜瓣的损伤,同时也防止筋膜瓣撕脱。术中一般不必纵行切开筋膜瓣两侧,即可使筋膜瓣牵拉下移至睑板上缘水平,若下移较困难,也只纵行切开内侧,外侧一般不切开,因外侧有面神经额支进入额肌,若外侧切开超过 0.5cm 以上有损伤面神经额支的可能,而导致手术失败^[4]。

四、额肌筋膜瓣牵拉下移与睑板缝合前,将筋膜瓣下端中央纵行向上劈开约 5~8mm,再与睑板上缘缝合。这样可将悬吊上睑的力量均匀地分散到三个固定点上,而不是原来的一个点,减少了手术后固定点的脱落或筋膜延长而出现上睑下垂的复发,同时可保持上睑的正常弧度,增加手术的成功率和优良率^[5]。

参 考 文 献

- 1 林茂昌, 主编. 现代整形美容学. 西安: 世界图书出版公司, 1997, 265
- 2 宋业光. 额肌瓣转移治疗重症上睑下垂. 中华整形烧伤外科杂志, 1985, 1: 34-36
- 3 杨景纯, 主编. 眼外肌学. 河南: 河南科学技术出版社, 1993, 24
- 4 林茂昌, 主编. 现代整形美容学. 西安: 世界图书出版公司, 1997, 265-266
- 5 戚可名, 薛富善, 主编. 整形外科特色治疗技术. 北京: 科学技术文献出版社, 2004

(收稿时间: 2006-04)