

【实验研究】

1.1 主要试剂与仪器 京尼平 (Wako, 日本); TUNEL 试剂盒 (Promega, 美国); INSTON 3343 材料测试机 (Illinois Tool Works Inc., 美国); 电子数显千分卡尺 (Sanling group, 香港); 光学显微镜 (Axioplan

2 imaging,德国);裂隙灯显微镜及摄像系统(SL-D7,日本)。

1.2 实验动物与分组 成年新西兰大白兔 20 只(中山大学动物实验中心),体质量 2.5 ~ 3.5 kg。按简单数字随机方法取一眼为治疗眼,Tenon's 囊下注射 0.5 mmol · L⁻¹京尼平 0.5 mL 2 次和 4 次各 10 只为 A 组、B 组,再按简单数字随机选取对侧眼 10 只为对照眼(对照组);每组 5 只测试生物力学,另 5 只进行组织学检查。爱尔卡因局部麻醉后,取右眼鼻上象限 1 点钟位(左眼 11 点钟位)角膜缘后 3 mm Tenon's 囊下注射 0.5 mmol · L⁻¹京尼平 0.5 mL。每 2 d 注射一次,分别注射 2 次和 4 次,每次注射后滴妥布霉素眼液和涂妥布霉素眼膏。最后一次注射后 2 d,过量麻醉处死兔。所有动物的应用均遵循 ARVO 关于眼和视觉科学中的动物应用的宣言。

1.3 生物力学测试

1.3.1 巩膜试件 眼球摘除后,从两直肌(右眼 1 点钟位,左眼 11 点钟位)后向视神经方向用双面刀片制作 4.0 mm × 10.0 mm 的巩膜试件。然后进行应力-应变实验,并在实验前用电子数显千分卡尺测量巩膜试件厚度。

1.3.2 应力-应变实验 应力-应变用 Instron 3343 材料测试机在室温下空气中测试。为防巩膜试件脱水,试件表面覆盖甲基纤维素。在正式实验前先进行 5 次预循环加载实验形成稳定的应力-应变关系,然后以 1.5 mm · min⁻¹的加载速度对巩膜试件施加应力直至试件断裂。收集极限应力、极限应变以及 20% 应变和弹性模量。

1.4 组织学检测

1.4.1 取材 兔子处死、10-0 丝线缝合定位后,立即摘除眼球并浸泡在中性混合福尔马林液中 2 d。制作 2 mm × 4 mm 组织块,赤道区组织块包含巩膜、脉络膜和视网膜以及邻近治疗区域的角膜组织(右眼 1 点钟位,左眼 11 点钟位)、邻近眼球的 2 mm 长的视神经。然后组织石蜡包埋,石蜡切片厚 4 μm。

1.4.2 HE 染色 角膜、赤道部眼球壁组织以及视神经 4 μm 厚石蜡切片 HE 染色后光镜观察。

1.4.3 TUNEL 检测 为了解京尼平是否会引起巩膜、脉络膜及视网膜细胞的凋亡,我们用 TUNEL 实验进行测试。

1.4.4 光镜观察 切片用光学显微镜检查。每张切片随机选 5 个视野来评估组织学变化。并以手动方法计数 TUNEL 阳性细胞数。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件中方差分析比较对照组与治疗组极限应力、极限应变以及弹性模量间的差异。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯观察 在 Tenon 囊下注射区域,注射后即出现泡样隆起,1 ~ 2 d 消退。随访中,治疗眼球结

膜轻微充血,但 1 ~ 2 d 自然消退。0.5 mmol · L⁻¹京尼平治疗后巩膜及结膜均没有明显的颜色变化(图 1)。邻近注射区域的角膜也无混浊、水肿以及上皮脱落。对照组球结膜、角膜及巩膜无水肿、颜色等变化。

Figure 1 After sub-Tenon injecting with genipin for 4 times (B), slightly conjunctival congestion, no discoloration of conjunctiva and sclera in untreated (A) and treated eyes 非治疗眼(A)与 Tenon 囊下注射 4 次(B)结膜和巩膜几乎没有颜色变化,治疗眼轻微充血

2.2 生物力学 京尼平治疗后兔眼巩膜生物力学提高(表 1)。与对照组比较,Tenon's 囊下注射 2 次和 4 次,巩膜的极限应力增加了 95% 和 161%;弹性模量(20% 应变)增加 204% 和 260%;而极限应变则下降了 13% 和 22%。治疗眼巩膜试件应力-应变曲线较对照组陡峭,在相同应力下治疗后巩膜抗变形能力增加(图 2)。

表 1 巩膜生物力学

Table 1 Biomechanical parameters of rabbit sclera strips			
(x̄ ± s)			
Group	Ultimate stress(<i>P</i> /kPa)	Ultimate strain(rate/%)	Modulus(<i>P</i> /MPa)
Control	4.20 ± 0.71	48.57 ± 3.37	11.27 ± 3.55
A	8.17 ± 1.52 *	42.45 ± 3.39	34.19 ± 8.18 *
B	10.96 ± 0.79 *	37.98 ± 1.48 *	40.53 ± 5.37 *

Note: Copmared with control group, * *P* < 0.05

Figure 2 Stress-strain curves in rabbit scleral strips treated with genipin 京尼平诱导兔眼巩膜胶原交联后巩膜应力-应变曲线

2.3 组织学检查

2.3.1 巩膜厚度 对照组、A 组、B 组巩膜厚度分别为 (389.00 ± 4.81) μm、(371.00 ± 6.04) μm 和 (375.60 ± 6.82) μm,组间比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。

2.3.2 HE 染色 各组对应区域的角膜无水肿以及无角膜基质细胞和上皮细胞丢失,并且内皮细胞完整(图 3A-C)。巩膜组织结构完整,无炎性细胞浸润及瘢痕组织;所有兔眼脉络膜和视网膜均无异常(图 3D-F)。邻近的视神经没有发现神经纤维的肿胀和

破碎(图 3G-I)。
2.3.3 TUNEL 为了解 0.5 mmol · L⁻¹京尼平对兔眼组织的细胞毒性作用,我们用 TUNEL 实验测试京尼平是否会引起眼组织细胞的凋亡(图 4)。结果显示在视网膜、脉络膜以及巩膜均未见 TUNEL 阳性细胞。

Figure 3 Photomicrograph of tissues in rabbit eye (HE, ×400). A, D and G: Untreated eyes; B, E, and H: Injections for 2 times; C, F and I: Injections for 4 times. A, B and C: Cornea immediately adjacent to the scleral treatment quadrant with integrated endothelium and without stromal edema, and loss of keratocytes; D, E and F: With intact retina, choroid and sclera; G, H and I: Adjacent optic nerve without fiber swelling and rupture 兔眼纤维组织图(HE 染色, ×400)。图 A、D 和 G 是对照眼;图 B、E 和 H 是京尼平注射 2 次眼;图 C、F 和 I 是注射 4 次眼。A、B、C 是邻近目标区域的角膜,无角膜基质水肿及角膜基质细胞丢失,角膜内皮完整。D、E、F 为目标区域巩膜、脉络膜和视网膜,图示结构完整。G、H、I 为邻近的视神经,无视神经纤维肿胀、破碎

3 讨论

眼轴延长是近视不断发展的重要特征,同时也是近视研究的热点。眼轴的延长与近视眼巩膜生物力学减弱有关^[15]。研究表明近视眼巩膜的生物力学如应力、应变参数值和弹性模量较正常眼低^[16]。这主要是近视眼巩膜中胶原分子内、分子间结构的不稳定和破坏引起的^[17]。通过胶原交联加强巩膜生物力学,增强对巩膜扩张的抵抗力以调节眼轴可能是防治近视进展的关键^[9]。

众所周知,胶原交联是生物体内常见的一种现象,其通过诱导胶原纤维分子内和分子间的共价结合增强胶原组织的生物力学特性。如随着年龄增

加,体内胶原交联增加,胶原组织的生物力学也增加^[18]。这可能也是为什么在老年人群中近视仍发展比较罕见的原因。目前研究显示有几种方法可以改善巩膜的生物力学,如核黄素-UVA、甘油醛以及脂肪族硝基醇等^[10-12]。京尼平是一种从梔子花中提取的天然交联剂,京尼平诱导的胶原交联已被证实可以显著提高生物组织的生物力学特性^[19-20]。

本研究表明,京尼平可以提高在兔眼巩膜的生物力学。0.5 mmol · L⁻¹京尼平治疗后,治疗眼巩膜的极限应力和弹性模量(20% 应变)均显著改善,应力-应变曲线明显较对照组陡峭。而应力-应变关系曲线反映巩膜在不同应力作用下巩膜组织变形的能力。因此表明京尼平治疗后巩膜能够对抗更高

Figure 4 Photomicrograph of TUNEL assay. No positive cell of TUNEL in sclera, choroid and retina in untreated eyes (A) and treated eyes with injections for 2 times (B) and 4 times (C) TUNEL 检测结果($\times 400$)。对照眼(A)和京尼平注射2次(B)及4次(C)治疗眼巩膜、脉络膜和视网膜均未发现 TUNEL 染色阳性细胞

的应力水平,而且不易变形、扩张。

京尼平的细胞毒性呈浓度依赖性,细胞对其有良好的耐受性^[21],但京尼平对细胞的毒性在不同组织和细胞中其阈值明显不同。有研究显示壳聚糖即使用 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的京尼平诱导交联,人视网膜色素上皮细胞对其仍具有良好的适应性。而且有研究显示, $1.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的京尼平对 L929 纤维细胞仅有轻微的细胞毒性^[19]。虽然京尼平注射部位的巩膜组织中京尼平浓度最高,但是我们的研究表明用药后并没有引起注射部位巩膜细胞的丢失和凋亡。另外,我们还检查了京尼平对邻近组织的影响。结果表明京尼平对邻近的角膜、视神经以及脉络膜和视网膜均无影响。而且研究显示低于 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的京尼平对大多数组织及细胞来说都是适宜的^[21]。这均表明 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的京尼平对兔眼来说是安全的。

综上,京尼平可以增强兔眼巩膜生物力学,而且 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的京尼平对兔眼巩膜组织、脉络膜以及视网膜细胞几乎没有细胞毒性。京尼平是一种潜在的增强巩膜抗变形能力以防止近视进展的天然交联剂。当然,由于拉伸实验并不能真实地反映近视发生发展的背景,甚至也没能模拟近视发生发展时眼压的变化,为证实京尼平的有效性和安全性,进一步在近视眼动物模型及临床中的研究是必要的。

参考文献

- 1 Vitale S, Sperduto RD, Ferris FL 3rd. Increased prevalence of myopia in the United States between 1971 - 1972 and 1999 - 2004 [J]. *Arch Ophthalmol*, 2009, 127(12): 1632-1639.
- 2 Sherwin JC, Khawaja AP, Broadway D, Luben R, Hayat S, Dalzell N, *et al*. Uncorrected refractive error in older British adults; the EPIC-Norfolk Eye Study [J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(7): 991-996.
- 3 Attebo K, Ivers RQ, Mitchell P. Refractive errors in an older population; the Blue Mountains Eye Study [J]. *Ophthalmology*, 1999, 106(6): 1066-1072.
- 4 Morgan IG, Ohno-Matsui K, Saw SM. Myopia [J]. *Lancet*, 2012, 379(9827): 1739-1748.
- 5 Goss DA, Winkler RL. Progression of myopia in youth: age of cessation [J]. *Am J Optom Physiol Opt*, 1983, 60(8): 651-658.

- 6 Saka N, Ohno-Matsui K, Shimada N, Sueyoshi S, Nagaoka N, Hayashi W, *et al*. Long-term changes in axial length in adult eyes with pathologic myopia [J]. *Am J Ophthalmol*, 2010, 150(4): 562-568.
- 7 Goldich Y, Barkana Y, Wussuku Lior O, Marcovich AL, Hirsh A, Avni I, *et al*. Corneal collagen cross-linking for the treatment of progressive keratoconus; 3-year prospective outcome [J]. *Can J Ophthalmol*, 2014, 49(1): 54-59.
- 8 Richoz O, Mavranakos N, Pajic B, Hafezi F. Corneal collagen cross-linking for ectasia after LASIK and photorefractive keratectomy: long-term results [J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(7): 1354-1359.
- 9 Wollensak G, Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2004, 30(3): 689-695.
- 10 Wollensak G, Iomdina E, Dittert DD, Salamatina O, Stoltzberg G. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2005, 83(4): 477-482.
- 11 Wollensak G, Iomdina E. Crosslinking of scleral collagen in the rabbit using glyceraldehyde [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2008, 34(4): 651-656.
- 12 Paik DC, Wen Q, Airiani S, Braunstein RE, Trokel SL. Aliphatic beta-nitro alcohols for non-enzymatic collagen cross-linking of scleral tissue [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 87(3): 279-285.
- 13 Akao T, Kobashi K, Aburada M. Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(12): 1573-1576.
- 14 Liu TX, Wang Z. Collagen crosslinking of porcine sclera using genipin [J]. *Acta Ophthalmol*, 2013, 91(4): e253-257.
- 15 Sergienko NM, Shargorogskaya I. The scleral rigidity of eyes with different refractions [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 250(7): 1009-1012.
- 16 Awetissow ES. The role of the sclera in the pathogenesis of progressive myopia (author's transl) [J]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 1980, 176(5): 777-781.
- 17 Funata M, Tokoro T. Scleral change in experimentally myopic monkeys [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1990, 228(2): 174-179.
- 18 Bailey AJ. Structure, function and ageing of the collagens of the eye [J]. *Eye (Lond)*, 1987, 1(2): 175-183.
- 19 Sundaragharavan HG, Monteiro GA, Lapin NA, Chabal YJ, Miksan JR, Shreiber DI. Genipin-induced changes in collagen gels: correlation of mechanical properties to fluorescence [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 87(2): 308-320.
- 20 Lima EG, Tan AR, Tai T, Marra KG, DeFail A, Ateshian GA, *et al*. Genipin enhances the mechanical properties of tissue-engineered cartilage and protects against inflammatory degradation when used as a medium supplement [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 91(3): 692-700.
- 21 Wang C, Lau TT, Loh WL, Su K, Wang DA. Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker--Genipin with therapeutic model cells [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011, 97(1): 58-65.