

引文格式: 闵幼兰, 袁晴, 马明洋, 刘康成, 朱佩文, 姜楠, 等. 苯扎溴铵和西酞普兰对小鼠角膜上皮和角膜全层厚度的影响[J]. 眼科新进展, 2018, 38(2): 101-105. doi: 10. 13389/j. cnki. rao. 2018. 0022

【实验研究】

# 苯扎溴铵和西酞普兰对小鼠角膜上皮和角膜全层厚度的影响<sup>△</sup>

闵幼兰 袁晴 马明洋 刘康成 朱佩文 姜楠 徐晓玮 申眉 叶蕾 邵毅

**作者简介:** 闵幼兰, 女, 1993 年 8 月出生, 湖北咸宁人, 在读硕士研究生。研究方向: 角膜病与眼表疾病。联系方式: 13907093352; E-mail: 1227725780@qq.com; ORCID: 0000-0002-6680-3936

**作者简介:** 袁晴, 女, 1994 年 3 月出生, 江西九江人, 在读硕士研究生。研究方向: 角膜病与眼表疾病。联系方式: 13755790984; E-mail: 2267421624@qq.com; ORCID: 0000-0001-5421-1055

注: 闵幼兰和袁晴同为第一作者。

**About MIN You-Lan:** Female, born in August, 1993. Postgraduate student. Tel: 13907093352; E-mail: 1227725780@qq.com; ORCID: 0000-0002-6680-3936

**About YUAN Qing:** Female, born in March, 1994. Postgraduate student. Tel: 13755790984; E-mail: 2267421624@qq.com; ORCID: 0000-0001-5421-1055

收稿日期: 2017-10-29  
修回日期: 2017-11-30  
本文编辑: 方红玲

<sup>△</sup>基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 81660158, 81160118, 81460092, 81400372); 江西省远航工程(编号: 2014022); 江西省自然科学基金重大项目(编号: 20161ACB21017); 江西省青年科学基金(编号: 20151BAB215016); 江西省科技支撑计划项目(编号: 20151BBG70223); 江西省卫计委科技计划面上项目(编号: 20175115, 20175116)

作者单位: 330006 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院眼科(闵幼兰, 袁晴, 马明洋, 刘康成, 朱佩文, 徐晓玮, 叶蕾, 邵毅); 361102 福建省厦门市, 厦门大学眼科研究所及附属眼科中心(姜楠, 申眉)

通讯作者: 邵毅, E-mail: freebee99@163.com; ORCID: 0000-0003-1571-2433

Received date: Oct 29, 2017  
Accepted date: Nov 30, 2017

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No: 81660158, 81160118, 81460092, 81400372); Jiangxi Province Voyage Project (No: 2014022); Natural Science Key Project of Jiangxi Province (No: 20161ACB21017); Youth Science Foundation of Jiangxi Province (No: 20151BAB215016); Technology and Science Foundation of Jiangxi Province (No: 20151BBG70223); Health Development Planning Commission Science Foundation of Jiangxi Province (No: 20175115, 20175116)

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University (MIN You-Lan, YUAN Qing, MA Ming-Yang, LIU Kang-Cheng, ZHU Pei-Wen, XU Xiao-Wei, YE Lei, SHAO Yi), Nanchang 330006, Jiangxi Province, China; Eye Institute of Xiamen University, Fujian Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science (JIANG Nan, SHEN Mei), Xiamen 361102, Fujian Province, China

**Responsible author:** SHAO Yi, E-mail: freebee99@163.com; ORCID: 0000-0003-1571-2433

## Effects of benzalkonium bromide and citalopram on the thickness of corneal epithelium and full-thickness of the cornea in mice

MIN You-Lan, YUAN Qing, MA Ming-Yang, LIU Kang-Cheng, ZHU Pei-Wen, JIANG Nan, XU Xiao-Wei, SHEN Mei, YE Lei, SHAO Yi

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of benzalkonium bromide and citalopram on the corneal epithelium and corneal thickness of mice using optical coherence tomography angiography (OCTA). **Methods** Together 60 mice were randomly divided into 5 groups (group A, B, C, D and E;  $n = 12$ ), with group A left untreated, group B receiving PBS eye drops, group C given benzalkonium bromide eye drops, group D undergoing intraperitoneal administration of citalopram suspension, and group E treated with combination of benzalkonium bromide eye drops and citalopram suspension. After 2 weeks, OCTA was applied for corneal subarea, followed by measurement of the thickness of corneal epithelium and full-thickness of the cornea of all mice, and then the mean values were calculated. **Results** The thickness of corneal epithelium and full-thickness of the cornea was  $(66 \pm 7) \mu\text{m}$  and  $(141 \pm 11) \mu\text{m}$  in the group A,  $(66 \pm 8) \mu\text{m}$  and  $(140 \pm 12) \mu\text{m}$  in the group B and D,  $(73 \pm 10) \mu\text{m}$  and  $(141 \pm 14) \mu\text{m}$  in the group C,  $(76 \pm 12) \mu\text{m}$  and  $(141 \pm 15) \mu\text{m}$  in the E group, respectively. And there was no significant difference in the thickness of corneal epithelium and full-thickness of the cornea before treatment and 2 weeks after treatment in the group A, B and D (all  $P > 0.05$ ), but both variables were markedly thickened in group C and E 2 weeks after treatment, and the difference was statistically significant (all  $P < 0.05$ ). Moreover, the increased levels on the both variables in the group E was higher than those in the group C 2 weeks after treatment, and the difference was statistically significant (both  $P < 0.05$ ). The average thickness of corneal epithelium and full-thickness of the cornea in the group C and E were significantly thickened after treatment, and the difference was statistically significant (all  $P < 0.05$ ). The average values of both variables in the group C and E were obviously larger than those in the group A, and the difference was statistically significant (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Citalopram alone has no significant effects on the corneal thickness by OCTA, whereas both the thickness of corneal epithelium and full-thickness of the cornea tend to thicken by benzalkonium bromide treatment, which has a synergistic effect on corneal thickening with citalopram.

**【Key words】** optical coherence tomography angiography; benzalkonium bromide; citalopram; cornea

**【摘要】 目的** 通过对光学相干断层扫描血管造影技术(optical coherence tomography angiography, OCTA)的应用,探究苯扎溴铵和西酞普兰对小鼠角膜上皮和角膜全层厚度的影响。**方法** 选取 60 只小鼠随机均分为 5 组,其中 A 组为阴性对照组, B 组用 PBS 眼液滴眼; C 组用苯扎溴铵眼液滴眼; D 组腹腔注射西酞普兰混悬液; E 组苯扎溴铵眼液滴眼联合腹腔注射西酞普

兰混悬液。在注射(滴眼)后2周,利用 OCTA 进行角膜分区,分别测量5组小鼠角膜各区域的角膜上皮和角膜全层厚度,并计算平均值。**结果** A组角膜上皮及角膜全层厚度分别为 $(66 \pm 7) \mu\text{m}$ 、 $(141 \pm 11) \mu\text{m}$ ,B、D两组角膜上皮均为 $(66 \pm 8) \mu\text{m}$ ,角膜全层厚度均为 $(140 \pm 12) \mu\text{m}$ ,C组分别为 $(73 \pm 10) \mu\text{m}$ 、 $(141 \pm 14) \mu\text{m}$ ,E组分别为 $(76 \pm 12) \mu\text{m}$ 、 $(141 \pm 15) \mu\text{m}$ 。注射(滴眼)后2周,与注射(滴眼)前相比,A组、B组及D组角膜上皮厚度及角膜全层厚度略有变化,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$ ),而C组和E组各区域角膜上皮厚度及角膜全层厚度明显增厚,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$ )。注射(滴眼)后2周,E组较C组相比,角膜上皮厚度及角膜全层厚度增厚更为显著,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组注射后与注射前相比,C组和E组角膜上皮厚度和角膜全层厚度平均值明显增大,差异有统计学意义(均为 $P < 0.05$ );与A组相比,C组和E组角膜上皮厚度和角膜全层厚度平均值明显增大,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$ )。**结论** 应用 OCTA 测量发现,单独使用西酞普兰对角膜厚度无明显影响,苯扎溴铵可使角膜上皮及角膜全层厚度增厚,且西酞普兰对其增厚具有协同作用。

**【关键词】** 光学相干断层扫描血管造影技术;苯扎溴铵;西酞普兰;角膜厚度

**【中图分类号】** R774

目前滴眼剂大多使用多剂量包装,为更好地保证滴眼剂的用药安全,使其在使用过程中保证无菌,防止其给用药安全带来极大隐患,多剂量的滴眼剂均加有抑菌剂。而苯扎溴铵是由溴化二甲苄基苄基羟铵同系物所组成的混合物,在滴眼剂中广泛用作抑菌剂,防止眼用制剂被微生物污染<sup>[1]</sup>。但长期使用含苯扎溴铵的滴眼剂对眼部有不同程度的不适感,甚至产生不同程度眼表变化,导致眼部不适、泪膜不稳定、结膜鳞状化生、杯状细胞丧失、炎症等<sup>[2-5]</sup>。有研究表明,苯扎溴铵对眼表有一定的毒性<sup>[6]</sup>,但其对角膜厚度的具体影响还尚未可知。而西酞普兰作为治疗抑郁症的药物,在其药物试验中的不良反应评估中,往往通过患者的自发报告症状列表进行,眼部相关症状在抗抑郁药物的临床试验报告中不常见<sup>[7]</sup>。因此,西酞普兰对角膜的相关影响还难以确定。

光学相干断层扫描血管造影(optical coherence tomography angiography,OCTA)作为快速的、非侵入性的新型血流成像技术,能直接检测到眼部病变范围、深度及新生血管长度、口径大小、面积等变化<sup>[8]</sup>。本实验旨在应用 OCTA 测量苯扎溴铵对小鼠角膜上皮和角膜全层厚度的影响,为苯扎溴铵对眼表结构及功能的影响提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 本研究使用体质量 $18 \sim 21 \text{ g}$ 、鼠龄 $6 \sim 8$ 周的小鼠(均为 SPF 级实验动物)。在南昌大学医学院动物实验中心,将小鼠隔离并饲养1周,随机选取符合质量和年龄标准的小鼠共60只,对其行眼科相关检查,确保所选小鼠无眼表疾病。在整个研究中,保持在标准化的环境中饲养:恒温为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,相对湿度 $60\% \pm 5\%$ ,交替12 h 黑暗周期(上午 $8:00$ 至晚上 $8:00$ )。本研究实验符合动物伦理委员会的要求<sup>[9]</sup>,对实验动物的利益进行了充分的考虑,尽可能减少实验动物的应激、痛苦和伤害,处置动物时尽量减少实验动物的痛苦。

**1.2 检查方法** 应用 AngioVue OCTA 系统(Optomvue, Inc., Fremont, CA),模式设置为 AngioRetina 模式(视网膜成像模式),横向分辨率设置为 $15 \mu\text{m}$ ,轴向分辨率设置为 $5 \mu\text{m}$ ,采用 $840 \text{ nm}$ 波长、宽度 $22$

$\mu\text{m}$ 的光源获取3D扫描图像<sup>[10]</sup>。采用分频辐去相关血管造影算法(split-spectrum amplitude-decorrelation angiography,SSADA)进行成像<sup>[11]</sup>。确定扫描中心,关闭自动聚焦功能,对所选小鼠进行检测,为控制变量,所有操作均由同一人完成。

**1.3 实验材料** 将西酞普兰粉末(citalopram HBr, Selleckchem 公司)与生理盐水以 $1:100$ 的比例混合制成混悬液,将其保存于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱备用。为避免温度过低对小鼠造成刺激,在注射前将其复温至室温。苯扎溴铵溶剂购自 Sigma 公司(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。

**1.4 实验动物分组** 对所选的60只小鼠随机均分为5组,每组12只(均为右眼),其中A组为阴性对照组,不做任何处理;B组 PBS 眼液滴眼,每天3次;C组为苯扎溴铵组:苯扎溴铵眼液滴眼( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),每天3次;D组为西酞普兰组:于每天上午8时,腹腔注射西酞普兰混悬液,注射剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量;E组为混合组:苯扎溴铵眼液滴眼,每天3次;腹腔注射西酞普兰混悬液,注射剂量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量。在注射(滴眼)后2周,利用 OCTA 分别测量5组小鼠的角膜上皮和角膜全层厚度。利用系统软件,以扫描中心为圆心将角膜划分为17个区域:将圆形扫描区域按直径 $2 \text{ mm}$ 、 $5 \text{ mm}$ 、 $6 \text{ mm}$ 的圆形区域划分,分别作为角膜中央、内环和外环。同时,按上侧(S)、鼻上侧(SN)、鼻侧(N)、鼻下侧(IN)、下侧(I)、颞下侧(IT)、颞侧(T)、颞上侧(ST)对内环和外环均分为17个区域,对各区域角膜厚度进行测量(图1)。

**1.5 测量与分析** 为测量角膜上皮和角膜全层各区域的局部厚度和变化量,应用 OCTA 对所选的小鼠的角膜中央直径 $2 \text{ mm}$ 区域和内环、外环各分区进行检测并分析,叠加双眼数据后,将各区域角膜上皮和角膜全层厚度的平均值制成图形。

**1.6 统计学分析** 本研究统计分析采用 SPSS 17.0 处理实验数据,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,完全随机设计资料的方差分析比较角膜上皮厚度和角膜全层厚度,计数资料用 $\chi^2$ 检验,检验水准均为 $\alpha = 0.05$ ;两组间均数比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 各组小鼠角膜上皮厚度和角膜全层厚度的测量结果** A、B、C、D、E 五组利用 OCTA 分别在注射后 2 周对各组小鼠右眼角膜全层厚度进行测量, 各组小鼠角膜前节情况见图 2。注射后 2 周与注射前相比, A 组、B 组及 D 组角膜上皮厚度及角膜全层厚度略有变化, 但差异均无统计学意义(均为  $P > 0.05$ ); 注射后 2 周与注射前相比, C 组和 E 组各区域角膜上皮厚度及角膜全层厚度明显增厚, 差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。注射后 2 周, D 组与 A 组和 B 组相比, 角膜上皮厚度及角膜全层厚度无明显改变, 差异均无统计学意义(均为  $P > 0.05$ ); 注射后 2 周, E 组与 C 组相比, 角膜上皮厚度及角膜全层厚度增厚更为显著, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ; 见表 1 和表 2)。

图1 OCTA 测量小鼠角膜上皮和全层各区域厚度示意图

图2 OCTA 测量各组小鼠角膜前节情况图。A~E 分别为 A 组至 E 组的角膜情况, A、B、D 组角膜较为清亮, C、E 组角膜稍有水肿; F~J 分别为 A 组到 E 组的角膜厚度大致情况, C、E 组角膜明显较 A、B、D 组偏厚。注: A~E 图角膜环直径由大到小分别为 6 mm、5 mm、2 mm

表 1 不同组别各区域角膜上皮厚度的比较

(角膜厚度/ $\mu\text{m}$ )					
位置	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
M	66 ± 7 <sup>△</sup>	66 ± 8 <sup>△</sup>	73 ± 10	66 ± 8 <sup>△</sup>	76 ± 12 * <sup>△</sup>
S5	68 ± 10 <sup>△</sup>	68 ± 9 <sup>△</sup>	73 ± 10	68 ± 10 <sup>△</sup>	76 ± 12 * <sup>△</sup>
SN5	66 ± 8 <sup>△</sup>	66 ± 7 <sup>△</sup>	69 ± 10	68 ± 8 <sup>△</sup>	73 ± 13 * <sup>△</sup>
N5	70 ± 10 <sup>△</sup>	70 ± 9 <sup>△</sup>	73 ± 13	70 ± 9 <sup>△</sup>	75 ± 14 * <sup>△</sup>
IN5	67 ± 10 <sup>△</sup>	68 ± 12 <sup>△</sup>	74 ± 13	69 ± 9 <sup>△</sup>	77 ± 12 * <sup>△</sup>
I5	68 ± 9 <sup>△</sup>	67 ± 9 <sup>△</sup>	75 ± 10	67 ± 10 <sup>△</sup>	78 ± 10 * <sup>△</sup>
IT5	69 ± 10 <sup>△</sup>	68 ± 10 <sup>△</sup>	74 ± 13	68 ± 9 <sup>△</sup>	78 ± 15 * <sup>△</sup>
T5	67 ± 9 <sup>△</sup>	67 ± 8 <sup>△</sup>	74 ± 10	67 ± 10 <sup>△</sup>	77 ± 12 * <sup>△</sup>
ST5	65 ± 9 <sup>△</sup>	66 ± 9 <sup>△</sup>	72 ± 11	67 ± 10 <sup>△</sup>	75 ± 12 * <sup>△</sup>
S6	68 ± 9 <sup>△</sup>	68 ± 8 <sup>△</sup>	72 ± 12	68 ± 9 <sup>△</sup>	75 ± 13 * <sup>△</sup>
SN6	69 ± 10 <sup>△</sup>	69 ± 9 <sup>△</sup>	73 ± 10	69 ± 11 <sup>△</sup>	74 ± 13 * <sup>△</sup>
N6	70 ± 11 <sup>△</sup>	70 ± 10 <sup>△</sup>	73 ± 11	70 ± 11 <sup>△</sup>	75 ± 11 * <sup>△</sup>
IN6	69 ± 10 <sup>△</sup>	69 ± 8 <sup>△</sup>	74 ± 13	68 ± 9 <sup>△</sup>	78 ± 15 * <sup>△</sup>
I6	68 ± 10 <sup>△</sup>	68 ± 9 <sup>△</sup>	75 ± 11	69 ± 9 <sup>△</sup>	77 ± 11 * <sup>△</sup>
IT6	58 ± 10 <sup>△</sup>	58 ± 11 <sup>△</sup>	65 ± 11	59 ± 11 <sup>△</sup>	68 ± 13 * <sup>△</sup>
T6	67 ± 9 <sup>△</sup>	69 ± 9 <sup>△</sup>	75 ± 10	70 ± 10 <sup>△</sup>	75 ± 12 * <sup>△</sup>
ST6	67 ± 9 <sup>△</sup>	69 ± 9 <sup>△</sup>	75 ± 10	70 ± 10 <sup>△</sup>	78 ± 12 * <sup>△</sup>

注: M: 角膜中央 2 mm 直径范围, S: 上方, N: 鼻侧, I: 下方, T: 颞侧, SN: 鼻上方, IN: 鼻下方, IT: 颞下方, ST: 颞上方; 5、6 分别代表距离角膜中央直径的范围; 与 A 组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与 C 组相比, <sup>△</sup>  $P < 0.05$

表 2 不同组别各区域角膜全层厚度的比较

(角膜厚度/ $\mu\text{m}$ )					
位置	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
M	141 ± 11 <sup>△</sup>	140 ± 12 <sup>△</sup>	141 ± 14	141 ± 12 <sup>△</sup>	141 ± 15 * <sup>△</sup>
S5	248 ± 13 <sup>△</sup>	249 ± 11 <sup>△</sup>	254 ± 13	248 ± 12 <sup>△</sup>	257 ± 13 * <sup>△</sup>
SN5	205 ± 13 <sup>△</sup>	203 ± 12 <sup>△</sup>	207 ± 15	204 ± 13 <sup>△</sup>	212 ± 18 * <sup>△</sup>
N5	179 ± 13 <sup>△</sup>	178 ± 14 <sup>△</sup>	182 ± 14	179 ± 14 <sup>△</sup>	182 ± 16 * <sup>△</sup>
IN5	212 ± 13 <sup>△</sup>	211 ± 12 <sup>△</sup>	217 ± 15	211 ± 10 <sup>△</sup>	220 ± 16 * <sup>△</sup>
I5	224 ± 15 <sup>△</sup>	223 ± 17 <sup>△</sup>	230 ± 17	224 ± 18 <sup>△</sup>	235 ± 19 * <sup>△</sup>
IT5	210 ± 14 <sup>△</sup>	209 ± 13 <sup>△</sup>	215 ± 14	208 ± 15 <sup>△</sup>	218 ± 15 * <sup>△</sup>
T5	212 ± 10 <sup>△</sup>	211 ± 11 <sup>△</sup>	215 ± 12	212 ± 13 <sup>△</sup>	212 ± 11 * <sup>△</sup>
ST5	168 ± 14 <sup>△</sup>	168 ± 13 <sup>△</sup>	179 ± 15	168 ± 12 <sup>△</sup>	185 ± 17 * <sup>△</sup>
S6	268 ± 20 <sup>△</sup>	268 ± 19 <sup>△</sup>	277 ± 19	269 ± 18 <sup>△</sup>	282 ± 19 * <sup>△</sup>
SN6	255 ± 16 <sup>△</sup>	254 ± 16 <sup>△</sup>	259 ± 19	255 ± 18 <sup>△</sup>	265 ± 19 * <sup>△</sup>
N6	218 ± 15 <sup>△</sup>	219 ± 15 <sup>△</sup>	221 ± 16	219 ± 17 <sup>△</sup>	226 ± 17 * <sup>△</sup>
IN6	236 ± 15 <sup>△</sup>	235 ± 13 <sup>△</sup>	239 ± 14	235 ± 13 <sup>△</sup>	243 ± 16 * <sup>△</sup>
I6	199 ± 15 <sup>△</sup>	200 ± 16 <sup>△</sup>	205 ± 16	198 ± 17 <sup>△</sup>	210 ± 18 * <sup>△</sup>
IT6	188 ± 14 <sup>△</sup>	189 ± 13 <sup>△</sup>	194 ± 15	189 ± 14 <sup>△</sup>	197 ± 16 * <sup>△</sup>
T6	195 ± 15 <sup>△</sup>	194 ± 14 <sup>△</sup>	198 ± 17	192 ± 14 <sup>△</sup>	201 ± 18 * <sup>△</sup>
ST6	188 ± 12 <sup>△</sup>	188 ± 11 <sup>△</sup>	192 ± 12	189 ± 12 <sup>△</sup>	198 ± 15 * <sup>△</sup>

注: M: 角膜中央 2 mm 直径范围, S: 上方, N: 鼻侧, I: 下方, T: 颞侧, SN: 鼻上方, IN: 鼻下方, IT: 颞下方, ST: 颞上方; 5、6 分别代表距离角膜中央直径的范围; 与 A 组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与 C 组相比, <sup>△</sup>  $P < 0.05$

**2.2 不同时间点各组角膜上皮厚度和角膜全层厚度比较** A、B、C、D、E 五组在注射后 2 周,分别测量角膜上皮厚度和角膜全层厚度的各区域平均值,采用重复测量数据的方差分析,结果见表 3 和表 4,结果显示:(1)各组注射后与注射前相比,C 组和 E 组角膜上皮厚度和角膜全层厚度明显增大,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );A 组、B 组、D 组角膜上皮厚度和角膜全层厚度略有增大,差异均无统计学

意义(均为  $P > 0.05$ );(2)与 A 组相比,C 组和 E 组角膜上皮厚度和角膜全层厚度明显增大,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );与 A 组相比,D 组角膜上皮厚度和角膜全层厚度无明显改变,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。 (3)与 C 组相比,A 组、B 组、D 组角膜上皮厚度及角膜全层厚度均明显变薄,而 E 组角膜上皮厚度及角膜全层厚度明显增厚,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。

表 3 5 组在注射前后角膜上皮厚度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

	角膜上皮厚度/ $\mu\text{m}$				
	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
注射前	67.11 $\pm$ 9.02	66.29 $\pm$ 9.34	67.64 $\pm$ 9.25	67.75 $\pm$ 9.64	66.94 $\pm$ 8.98
注射后	67.29 $\pm$ 9.29 <sup>&amp;</sup>	67.41 $\pm$ 8.94 <sup>&amp;</sup>	72.82 $\pm$ 10.71 <sup>*#</sup>	67.82 $\pm$ 11.21 <sup>&amp;</sup>	76.71 $\pm$ 11.41 <sup>*##</sup>

注:与 A 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与注射前比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与 C 组比较,<sup>&</sup> $P < 0.05$

表 4 5 组在注射前后角膜全层厚度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

	角膜全层厚度/ $\mu\text{m}$				
	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
注射前	206.43 $\pm$ 15.23	209.85 $\pm$ 14.45	208.74 $\pm$ 14.34	207.15 $\pm$ 12.97	207.19 $\pm$ 13.86
注射后	208.59 $\pm$ 14.65 <sup>&amp;</sup>	208.18 $\pm$ 13.71 <sup>&amp;</sup>	213.53 $\pm$ 15.12 <sup>*#</sup>	208.29 $\pm$ 14.24 <sup>&amp;</sup>	218.71 $\pm$ 16.47 <sup>*##</sup>

注:与 A 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与注射前比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与 C 组比较,<sup>&</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

OCTA 作为一种非接触性的成像系统,具有扫描快、无创、高分辨等特点,可以在不使用任何染料的情况下,评估角膜病理特征,发现角膜各区域厚度具有的差异性。本研究利用 OCTA 初步分析了苯扎溴铵及西酞普兰对小鼠角膜上皮和角膜全层厚度的影响。

目前,大多数滴眼液均使用苯扎溴铵作为防腐剂,通过抑制细菌来达到维持药物功效、延长药物的寿命的目的<sup>[12]</sup>,但有研究表明,苯扎溴铵对眼表有一定的毒性<sup>[13-15]</sup>,在一定程度上可加速促炎细胞因子分泌,增加了对眼表细胞的损伤<sup>[16-17]</sup>。在各种动物模型中,苯扎溴铵的使用导致小鼠、大鼠和兔的泪膜稳定性下降,角膜和结膜上皮破裂,角膜新生血管形成和炎症反应等损伤,从而造成干眼<sup>[18-19]</sup>。

苯扎溴铵是所有多剂量滴眼液配方的重要组成部分,它可以诱导角膜上皮功能障碍,即使在非常低的剂量下也可能损害角膜上皮屏障。在体内和体外不同研究之间,损伤眼表面所需的苯扎溴铵的浓度变化有很大的差异<sup>[20]</sup>。一般来说,滴眼液中苯扎溴铵的浓度范围为 0.04 ~ 0.10 g · L<sup>-1</sup>,长期使用可能会导致眼表损伤<sup>[21]</sup>。苯扎溴铵可以被降解为过氧化氢,从而引起氧化应激并引发角膜和结膜上皮细胞中的炎症反应。即使在低浓度下,苯扎溴铵可以诱导如 IL-1、IL-6、HLA-DR 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达水平显著增加<sup>[21-22]</sup>。同时,由苯扎溴铵引起的干眼的泪液渗透性高,可刺激炎症细胞因子的产生<sup>[23-24]</sup>。

而西酞普兰是一种抑制快动眼睡眠的治疗抑郁

症的药物,研究均报道了使用抗抑郁药物和干眼症风险之间的密切联系<sup>[25-26]</sup>。此外,对抑郁症患者干眼症极少进行系统的研究。因此,探究西酞普兰对角膜的影响很大程度上可以为干眼症的诊断提供实验依据。但本实验发现,单纯应用西酞普兰对角膜厚度的影响并不显著,这可能是由于西酞普兰的应用影响睡眠,并且使得泪液蒸发增强,从而对泪膜的稳定性造成影响而导致了干眼症状的出现,而未对角膜造成损伤。其造成干眼症与除抗胆碱能系统以外的机制相关。

本实验结果发现,苯扎溴铵和西酞普兰的联合应用后,角膜上皮及角膜全层的厚度的增加较单独应用苯扎溴铵时更为显著。因此,西酞普兰所导致的泪膜不稳定和苯扎溴铵具有协同效应,在一定程度上加剧了苯扎溴铵对角膜的损伤。

总之,在苯扎溴铵和西酞普兰的联合应用中,角膜厚度增加更为显著。因此,在苯扎溴铵和西酞普兰的联合应用下,其对眼表的损伤加重,但其引起炎症反应和细胞损伤后再生等机制还有待进一步探究。

### 参考文献

[1] BAUDOUIN C, LABBÉ A, LIANG H, PAULY A, BRIGNOLE-BAUDOUIN F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2010, 29(4): 312-334.  
[2] PISELLA PJ, HAMARD PP, BAUDOUIN C. Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an *ex vivo* and *in vitro* study[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(5): 1360-1368.  
[3] PAULY A, BRIGNOLE-BAUDOUIN F, LABBÉ A, LIANG H, WARNET JM, BAUDOUIN C. New tools for the evaluation of toxic ocular surface changes in the rat[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(12): 5473-5483.

- [4] LI C, SONG Y, LUAN S, WAN P, LI N, TANG J, *et al.* Research on the stability of a rabbit dry eye model induced by topical application of the preservative benzalkonium chloride [J]. *ISO*, 2012, 7(3): e33688.
- [5] AKIHIKO O, HIDETOSHI T, KOICHI T, KAWAZU K. Ocular toxicity of benzalkonium chloride homologs compared with their mixtures [J]. *J Toxicol Pathol*, 2013, 26(4): 343-349.
- [6] PFISTER RR, BURSTEIN N. The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium: a scanning electron microscope study [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1976, 15(4): 246-259.
- [7] HU XH, BULL SA, HUNKELER EM, MING E, LEE JY, FIREMAN B, *et al.* Incidence and duration of side effects and those rated as bothersome with selective serotonin reuptake inhibitor treatment for depression: patient report versus physician estimate [J]. *J Clin Psychiat*, 2004, 65(7): 959-965.
- [8] ANG M, CAI Y, SHAHIPASAND S, SIM DA, KEANE PA, SNG CC, *et al.* En face optical coherence tomography angiography for corneal neovascularisation [J]. *Br J Ophthalmol*, 2016, 100(5): 616-621.
- [9] SHAO Y, YU Y, LIU QP, LI JM, DONG F, HUANG X, *et al.* Effects of Honghua preserved amniotic membrane on scar healing in experimental glaucoma surgery [J]. *Int J Ophthalmol*, 2014, 7(2): 226-231.
- [10] SPAIDE RF, KLANCNIK JM, COONEY MJ. Retinal vascular layers imaged by fluorescein angiography and optical coherence tomography angiography [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2015, 133(1): 45-50.
- [11] ANG M, SIM DA, KEANE PA, SNG CC, EGAN CA, TUFAIL A, *et al.* Optical coherence tomography angiography for anterior segment vasculature imaging [J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(9): 1740-1747.
- [12] JIANG X, MOUDGIL KD. The unveiling of hidden t-cell determinants of a native antigen by defined mediators of inflammation: implications for the pathogenesis of autoimmunity [J]. *Scand J Immunol*, 2006, 63(5): 338-346.
- [13] LIN Z, LIU X, ZHOU T, YI HW, LI B, HUI H, *et al.* A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkoniumchloride [J]. *Mol Vis*, 2011, 17(17): 257-264.
- [14] SARKAR J, CHAUDHARY S, NAMAVARI A, OZTURK O, CHANG JH, YCO L, *et al.* Corneal neurotoxicity due to topical benzalkoniumchloride [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(4): 1792-1802.
- [15] RASMUSSEN CA, KAUFMAN PL, KILAND JA. Benzalkonium chloride and glaucoma [J]. *J Ocul Pharmacol TH*, 2014, 30(2-3): 163-169.
- [16] NAKAGAWA S, USUI T, YOKOO S, OMICHI S, KIMAKURA M, MORI Y, *et al.* Toxicity evaluation of antiglaucoma drugs using stratified human cultivated corneal epithelial sheets [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(9): 5154-5160.
- [17] SMEDOWSKI A, PATERNO JJ, TOROPAINEN E, SINHA D, WYLEGALA E, KAARNIRANTA K. Excipients of preservative-free latanoprost induced inflammatory response and cytotoxicity in immortalized human HCE-2 corneal epithelial cells [J]. *J Biochem Pharmacol Res*, 2014, 2(4): 175-184.
- [18] AMMAR DA, NOECKER RJ, KAHOOK MY. Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells [J]. *Adv Ther*, 2010, 27(11): 837-845.
- [19] GALLETTI JG, GABELLONI ML, MORANDE PE, SABBIONE F, VERMEULEN ME, TREVANI AS, *et al.* Benzalkonium chloride breaks down conjunctival immunological tolerance in a murine model [J]. *Mucosal Immunol*, 2013, 6(1): 24-34.
- [20] CHA S H, LEE J S, OUM B S, KIM CD. Corneal epithelial cellular dysfunction from benzalkonium chloride (BAC) *in vitro* [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2004, 32(2): 180-184.
- [21] ROLANDO M, BARABINO S, MINGARI C, MORETTI S, GIUFFRIDA S, CALABRIA G. Distribution of conjunctival HLA-DR expression and the pathogenesis of damage in early dry eyes [J]. *Cornea*, 2005, 24(8): 951-954.
- [22] EPSTEIN SP, CHEN D, ASBELL PA. Evaluation of biomarkers of inflammation in response to benzalkonium chloride on corneal and conjunctival epithelial cells [J]. *J Ocul Pharmacol TH*, 2009, 25(5): 415-424.
- [23] LUO L, LI DQ, CORRALES RM, PFLUGFELDER SC. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface [J]. *Eye Contact Lens*, 2005, 31(5): 186-193.
- [24] LEMP M A. The definition and classification of dry eye disease; report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007) [J]. *Ocul Surf*, 2007, 5(2): 75-92.
- [25] MOSS SE, KLEIN R, KLEIN BE. Long-term incidence of dry eye in an older population [J]. *Optom Vis Sci Offic Publicat Am Acad Optom*, 2008, 85(8): 668-674.
- [26] RICHA S, YAZBEK JC. Ocular adverse effects of common psychotropic agents: a review [J]. *Cns Drugs*, 2010, 24(6): 501-526.