

# 角膜穿通伤早期兔眼角膜上皮基底膜的修复和再生过程

徐路星<sup>1</sup> 吴金玲<sup>1</sup> 王霜宁<sup>2</sup> 李霞<sup>1</sup>

<sup>1</sup>广西医科大学第一附属医院眼科, 南宁 530021; <sup>2</sup>广西医科大学第二附属医院眼科, 南宁 530007

通信作者: 李霞, Email: lixiagmu066@163.com

**【摘要】** 目的 观察角膜穿通伤早期兔眼角膜上皮基底膜 (EBM) 的修复和再生过程。方法 采用随机数字表法将 42 只新西兰白兔分为建模后 1、3、5、7、14、21 和 30 d 组, 每组 6 只, 均取右眼建模作为实验眼。另取 6 只未经任何处理的新西兰白兔作为正常对照组。应用 2.0 mm 环钻建立兔角膜环钻穿通伤模型。建模后各组于相应时间点用裂隙灯显微镜下观察角膜, Image J 软件测定角膜荧光素着色面积评估上皮愈合情况, Fantes 分级量表评估角膜混浊程度, 苏木精-伊红染色观察角膜上皮和基质修复情况, 透射电子显微镜下观察 EBM 再生情况。结果 兔角膜穿通伤后各组角膜荧光素染色面积总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 3\,398.88, P < 0.01$ ), 其中建模后 1、3、5、7 和 14 d 组角膜上皮荧光素着色面积分别为  $(4.00 \pm 0.10)$ 、 $(3.11 \pm 0.10)$ 、 $(2.00 \pm 0.06)$ 、 $(0.90 \pm 0.04)$  和  $(0.67 \pm 0.03) \text{ mm}^2$ , 角膜上皮荧光素着色面积逐渐缩小, 两两比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 建模后 21 d 和 30 d 组均未见角膜上皮荧光素着色。建模后 1、3、5、7、14、21 和 30 d 组角膜混浊程度评分分别为  $3.44 \pm 0.53$ 、 $0.67 \pm 0.25$ 、 $1.33 \pm 0.50$ 、 $2.11 \pm 0.60$ 、 $2.44 \pm 0.53$ 、 $3.22 \pm 0.44$  和  $3.78 \pm 0.44$ , 建模后 1~5 d 角膜混浊评分下降, 建模后 5~30 d 角膜混浊评分逐渐升高, 各组角膜混浊评分总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 51.182, P < 0.01$ )。苏木精-伊红染色结果显示角膜伤口区开始由纤维斑块填充, 建模后 3 d 组单层上皮覆盖, 建模后 5 d 组大量成纤维细胞及其分泌的细胞外基质填充, 建模后 21 d 及 30 d 组前部基质中胶原纤维排列紧密。透射电子显微镜下观察结果显示, 伤口区由肌成纤维细胞及不规则胶原纤维填充, 建模后 21 d 角膜基质开始重塑, EBM 于建模后 21 d 和 30 d 开始不完全再生。结论 兔角膜穿通伤后角膜纤维化启动并逐渐加重, EBM 不完全再生。

**【关键词】** 上皮基底膜; 角膜损伤修复; 穿通伤; 兔

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81060076、81360144); 广西自然科学基金项目 (2017GXNSFAA198250); 广西医学高层次骨干人才培养 (139 计划) 项目 (XK2019016)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.02.003

## Procedure for early corneal basement membrane repair and regeneration in corneal penetrating injury in rabbits

Xu Luxing<sup>1</sup>, Wu Jinling<sup>1</sup>, Wang Shuangning<sup>2</sup>, Li Xia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China  
Corresponding author: Li Xia, Email: lixiagmu066@163.com

**[Abstract]** **Objective** To describe the procedure for early corneal epithelial basement membrane (EBM) repair and regeneration in rabbits with corneal penetrating injury. **Methods** Forty-two New Zealand white rabbits were divided into modeling 1-, 3-, 5-, 7-, 14-, 21-, and 30-day groups using a random number table method, with 6 rabbits in each group; the right eyes were selected as the experimental eyes. Another 6 New Zealand white rabbits without any treatment were taken as the normal control group. A 2.0-mm trephine was used to ablate a full-thickness button of the central corneal tissue of each rabbit. The corneas were observed by slit lamp biomicroscopy at the respective time points after the trephined injury. Corneal epithelial fluorescein staining was used to evaluate re-epithelialization with Image J software and haze grading was evaluated with the Fantes classification. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the healing process of the cornea. Transmission electron microscopy was conducted to assess the regeneration of the EBM and the reconstruction of the cornea. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Guangxi Medical University (No. 201811031). The use and care of the experimental animals complied with the Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. **Results** The corneal epithelial fluorescein areas in modeling 1-, 3-, 5-, 7-, and 14-day group were  $(4.00 \pm 0.10)$ ,  $(3.11 \pm 0.10)$ ,  $(2.00 \pm 0.06)$ ,

( $0.90 \pm 0.04$ ) and ( $0.67 \pm 0.03$ )  $\text{mm}^2$ , respectively, with a significant difference among them ( $F = 3398.88, P < 0.01$ ). With the increasing of time after modeling, the corneal epithelium fluorescein area was gradually reduced, showing significant differences between any two groups (all at  $P < 0.05$ ), and the staining was disappeared at 21 and 30 days after modeling. The corneal haze grades were  $3.44 \pm 0.53, 0.67 \pm 0.25, 1.33 \pm 0.50, 2.11 \pm 0.60, 2.44 \pm 0.53, 3.22 \pm 0.44$  and  $3.78 \pm 0.44$  in modeling 1-, 3-, 5-, 7-, 14-, 21-, and 30-day group, respectively. The corneal opacity score gradually decreased during 1-5 days after modeling and gradually increased during 5-30 days after modeling, with a significant difference among them ( $F = 51.182, P < 0.01$ ). Hematoxylin-eosin staining revealed that a fibrin clot formed in the wound area, and a single layer of epithelium covered the area at initial 3 days after modeling, and a large number of fibroblasts and some extracellular matrix were found at 5 days after modeling. At 21 and 30 days after modeling, the collagen fibers were tightly arranged in the anterior stroma. Transmission electron microscopy showed that the wound was filled with irregular collagen fibers and myofibroblasts. The stroma was remodeled at 21 days after modeling, and defective regeneration of the EBM was detected at 21 and 30 days after modeling. **Conclusions** Corneal fibrosis initiates after corneal penetrating injury in rabbits and gradually aggravates, the EBM regenerates defectively.

**[Key words]** Epithelial basement membrane; Cornea wound healing; Penetrating injury; Rabbit

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81060076, 81360144); Guangxi Natural Science Foundation Program (2017GXNSFAA198250); Guangxi Cultivation of Medical High Level Key Talents (139 Program) (XK2019016)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.02.003

角膜创伤反应可导致角膜基质纤维化而使角膜失去透明性,肌成纤维细胞的生成及持续存在是角膜基质纤维化的重要因素<sup>[1]</sup>。角膜上皮基底膜(epithelial basement membrane, EBM)再生对肌成纤维细胞生成及其生物学行为发挥调控作用<sup>[2]</sup>。角膜外伤、手术创伤或感染后角膜上皮基底膜结构和功能的重建对角膜组织的转归至关重要<sup>[3-4]</sup>。目前角膜穿通伤引起的角膜混浊仍是导致视觉功能障碍的主要原因之一,而伤后早期角膜 EBM 的再生过程及其干预靶点的研究较少。本研究中采用角膜环钻损伤模型探讨角膜穿通伤早期修复过程中角膜的组织学、病理生理变化及 EBM 的再生,为角膜穿通伤的抗瘢痕治疗研究提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** 健康 3 月龄普通级纯种雄性新西兰白兔 48 只(广西医科大学动物中心提供),体质量  $1.5 \sim 2.0$  kg,均无角膜疾病,饲养温度为  $20 \sim 26$  °C,湿度为  $40\% \sim 70\%$ 。采用随机数字表法将实验兔分为建模后 1、3、5、7、14、21 和 30 d 组,每组 6 只,均取右眼作为实验眼。另取 6 只未经任何处理的新西兰白兔作为正常对照组。实验动物的使用和喂养遵循美国视觉与眼科学研究协会制定的科研动物使用规范。本研究方案经广西医科大学伦理委员会审核批准(批文号:201811031)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社);盐酸丙美卡因滴眼液(美国 Alcon

公司);盐酸左氧氟沙星滴眼液(珠海联邦制药股份有限公司);荧光素钠(广西梧州制药集团股份有限公司)。显微手术器械(上海医疗器械股份有限公司)。眼科显微镜、倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);直径 2.0 mm 环钻(美国 Storz 公司);裂隙灯显微镜(北京拓普康公司);透射电子显微镜(日本 Hitach 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 角膜穿通伤动物模型的建立** 参照 Cannon 等<sup>[5]</sup>的方法采用兔角膜环钻建立角膜穿通伤修复模型。术前实验眼以复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳,防止术中虹膜嵌顿于环钻缺损区。采用质量分数 1% 戊巴比妥钠 3 ml/kg 耳缘静脉注射进行全身麻醉,以盐酸丙美卡因滴眼液点眼行表面麻醉。术眼放置儿童开睑器充分暴露角膜,用直径 2.0 mm 无菌环钻在右眼角膜中央钻去全层角膜组织,伤口区在 20 min 内形成纤维蛋白凝块,前房得以重建。术后术眼用质量分数 0.5% 左氧氟沙星滴眼液点眼,每天 4 次。术后裂隙灯显微镜下观察角膜感染、前房积脓等炎症反应情况,剔除炎症反应严重者并补充新的模型。分别于术后 1、3、5、7、14、21 和 30 d 观察角膜上皮愈合情况,根据角膜混浊程度进行分级。分别于相应时间点用戊巴比妥钠过量麻醉法处死各组实验兔,取角膜标本行组织病理学和角膜超微结构检查,取角膜时在伤口周围保留约 0.5 mm 正常组织。

**1.2.2 角膜荧光素染色评估角膜损伤程度** 分别于建模成功后 1、3、5、7、14、21 和 30 d 用质量分数 1% 荧光素钠溶液 1 滴点眼,在裂隙灯显微镜钴蓝光下摄像,用 Image J 软件测定并计算角膜上皮缺损面积。

**1.2.3 角膜混浊分级评估角膜瘢痕程度** 在上述各时间点由1名有经验的眼科医生在未知各组动物分配情况下用裂隙灯显微镜评估兔角膜角膜混浊程度,参照文献[6-7]中采用的量表进行分级。0级:角膜完全透明;0.5级:在裂隙灯生物显微镜下仔细倾斜照射可见轻度混浊;1级:角膜混浊较明显,但不影响虹膜细节的可见性;2级:角膜明显混浊,可导致虹膜细节轻度遮挡;3级:角膜中度遮挡虹膜和晶状体;4级:角膜完全混浊。

**1.2.4 角膜标本组织病理学检查** 将角膜标本快速浸于质量分数4%多聚甲醛溶液中固定至少24h,石蜡包埋。连续冠状切片,厚度为5 μm,常规脱蜡,苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察组织形态变化。

**1.2.5 角膜标本超微结构检查** 参照 Fantès 等<sup>[6]</sup>所述的方法制备样品。角膜标本迅速置于质量分数2.5%戊二醛和4%多聚甲醛混合液中固定24h, PBS清洗3次,每次10 min,质量分数1%锇酸4℃固定2h,梯度乙醇、丙酮逐级脱水,将中央角膜块固定于环氧树脂介质中并切片,厚度1 μm,用甲苯胺蓝染色以定位角膜损伤区。制作超薄切片,透射电子显微镜下观察角膜修复期组织超微结构变化。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料测定数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 mean±SD 表示,组间均数经 Levene 检验方差齐。采用随机独立分组多水平研究设计,各组实验眼检测指标总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组兔眼角膜上皮损伤程度比较**

正常对照组角膜上皮完整、光滑,未见荧光素染色。建模后随着时间推移角膜上皮逐渐修复,荧光素染色面积逐渐缩小。建模后21d和30d组角膜上皮完全愈合,未见荧光素着色(图1)。各组兔角膜荧光

素染色面积总体比较差异有统计学意义( $F = 3\,398.88, P < 0.01$ ),建模后1~14d组兔角膜上皮荧光素着色面积两两比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(表1)。

**2.2 各组实验眼角膜伤口区混浊分级**

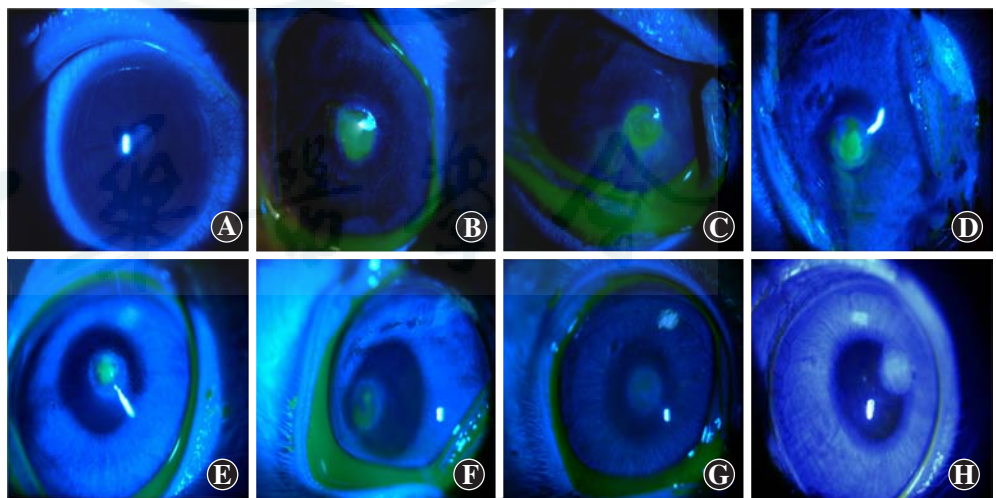
正常对照组角膜完全透明。建模后1d和3d组角膜伤口区主要由不透明的纤维斑块填充,角膜混浊逐渐减轻;建模后5d组角膜伤口区可见轻微不均匀混浊,之后角膜混浊逐渐加重,建模后30d组角膜完

**表1 各组角膜荧光素染色面积比较(mean±SD, mm<sup>2</sup>)**  
**Table 1 Corneal fluorescein staining area in different groups penetrating injury in rabbits(mean±SD, mm<sup>2</sup>)**

组别	眼数	角膜上皮损伤面积
建模后1d组	6	4.00±0.10
建模后3d组	6	3.11±0.10 <sup>a</sup>
建模后5d组	6	2.00±0.06 <sup>ab</sup>
建模后7d组	6	0.90±0.04 <sup>abc</sup>
建模后14d组	6	0.67±0.03 <sup>abcd</sup>
<i>F</i> 值		3 398.88
<i>P</i> 值		<0.01

注:与建模后1d组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.05;与建模后3d组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.05;与建模后5d组比较,<sup>c</sup>*P* < 0.05;与建模后7d组比较,<sup>d</sup>*P* < 0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验)

Note: Compared with the modeling 1-day group, <sup>a</sup>*P* < 0.05; compared with the modeling 3-day group, <sup>b</sup>*P* < 0.05; compared with the modeling 5-day group, <sup>c</sup>*P* < 0.05; compared with the modeling 7-day group, <sup>d</sup>*P* < 0.05 (ANOVA, LSD-*t* test)



**图1 各组兔眼角膜上皮缺损面积** A:正常对照组角膜光滑,无荧光素染色 B:建模后1d组角膜损伤区均着色 C:建模后3d组角膜着色面积小于建模后1d组 D:建模后5d组角膜伤口区染色面积进一步缩小 E:建模后7d组伤口区染色面积较前减小 F:建模后14d组角膜上仅有较小面积着色 G:建模后21d组角膜未见荧光素染色 H:建模后30d组角膜未见着色

**Figure 1 Defective area of corneal epithelium observed in different groups** A: The cornea in the normal control group was smooth B: The corneal defective area was stained in the modeling 1-day group C: Compared with the modeling 1-day group, the corneal stained area was reduced in the modeling 3-day group D: In the modeling 5-day group, the stained area was decreased, with no staining around the corneal wound E: In the modeling 7-day group, the stained area was smaller F: A small staining area was found in the modeling 14-day group G: No staining was found in the modeling 21-day group H: No staining was found in the modeling 30-day group

全混浊(图 2)。建模后 1~5 d 组角膜混浊评分下降,建模后 5~30 d 组角膜混浊评分逐渐升高,角膜穿通伤后不同时间组实验眼角膜混浊评分总体比较差异有统计学意义( $F=51.182, P<0.01$ ),建模后 1 d 组与建模后 21 d、30 d 组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),与建模后 7 d 组与建模后 14 d 组比较,差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ ),其他各组之间两两比较,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )(表 2)。

### 2.3 各组实验眼角膜组织病理学表现

正常对照组角膜上皮细胞排列规整,厚度均一,基质层纤维排列整齐(图 3A)。建模后 1 d 组角膜伤口区周围基质肿胀,伤口区由无细胞纤维斑块填充,少量炎性细胞浸润(图 3B);建模后 3 d 组角膜伤口区主要由无细胞纤维斑块填充,少量单层上皮细胞沿纤维蛋白凝块表面生长,少量炎性细胞浸润(图 3C);建模后 5 d 组伤口区邻近的上皮沿纤维蛋白凝块表面交叉,伤口区主要纤维蛋白凝块填充,且由多层角膜上皮细胞覆盖,炎性细胞增多(图 3D);建模后 7 d 组伤口区上层的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)填充,大量炎性细胞浸润(图 3E);建模后 14 d 组伤口区纤维蛋白块消失,由纤维细胞和不规则的 ECM 组成,角膜上皮厚度减少且更加规整,可见少量炎性细胞(图 3F);

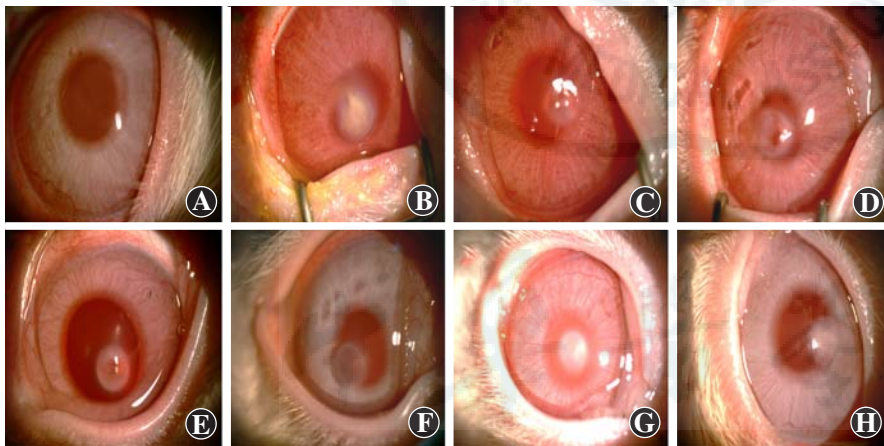


图 2 裂隙灯显微镜下各组兔眼角膜混浊情况 A:正常对照组角膜完全透明 B:建模后 1 d 组角膜伤口区由不透明的纤维斑块填充,遮挡虹膜 C:建模后 3 d 组角膜伤口区由半透明的纤维斑块填充,虹膜可见 D:建模后 5 d 组伤口边缘混浊,中央半透明状,隐约可见晶状体和虹膜 E:建模后 7 d 组伤口边缘明显混浊,角膜中央较少半透明状组织,虹膜尚可见 F:建模后 14 d 组伤口区均匀混浊,虹膜组织模糊可见 G:建模后 21 d 组伤口区致密混浊,虹膜和晶状体中重度遮挡 H:建模后 30 d 组伤口区完全混浊

Figure 2 Corneal opacity of experimental eyes under slit-lamp microscope in different groups

A: Cornea was transparent in the normal control group B: In the modeling 1-day group, the wound area was filled by opaque fibrous plaques C: In the modeling 3-day group, the corneal wound area was filled with translucent fibrous plaques D: In the modeling 5-day group, the edges of the wound were opaque, the lens and iris were dimly visible E: In the modeling 7-day group, apparent haze was found in peripheral area with moderate obscuration of iris details F: In the modeling 14-day group, uniformly opaque was found in wound area G: In the modeling 21-day group, dense opacity was found in wound area with moderate obscuration of iris and lens H: In the modeling 30-day group, complete opacification was found in the wound area

表 2 各组角膜混浊分级比较(mean±SD)  
Table 2 Comparison of corneal haze grading in different groups(mean±SD)

组别	眼数	角膜混浊分级
建模后 1 d 组	6	3.44±0.53
建模后 3 d 组	6	0.67±0.25 <sup>a</sup>
建模后 5 d 组	6	1.33±0.50 <sup>ab</sup>
建模后 7 d 组	6	2.11±0.60 <sup>abc</sup>
建模后 14 d 组	6	2.44±0.53 <sup>abc</sup>
建模后 21 d 组	6	3.22±0.44 <sup>bcde</sup>
建模后 30 d 组	6	3.78±0.44 <sup>bcdef</sup>
F 值		51.182
P 值		<0.01

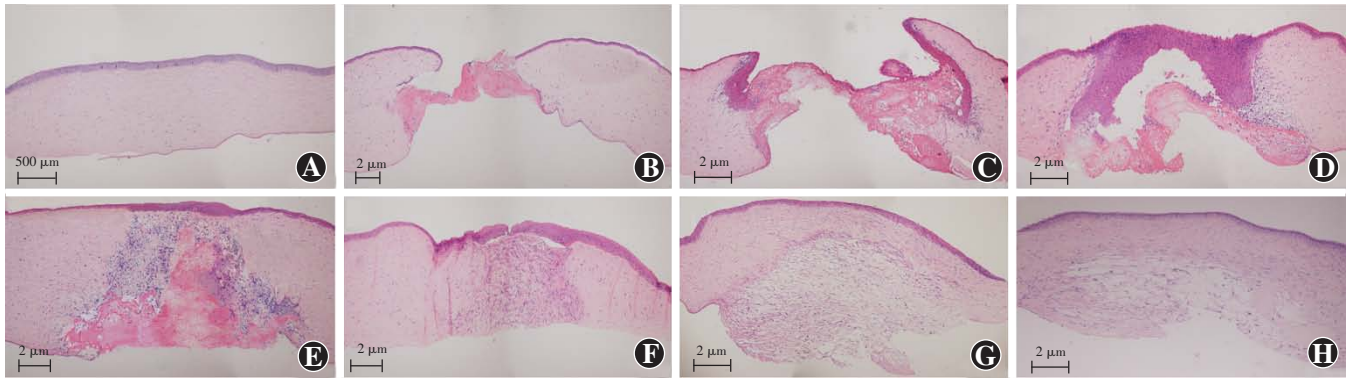
注:与 a 建模后 1 d 组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与建模后 3 d 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与建模后 5 d 组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与建模后 7 d 组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$ ;与建模后 14 d 组比较,<sup>e</sup> $P<0.05$ ;与建模后 21 d 组比较,<sup>f</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验)

Note: Compared with the modeling 1-day group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; compared with the modeling 3-day group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; compared with the modeling 5-day group, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; compared with the modeling 7-day group, <sup>d</sup> $P<0.05$ ; compared with the modeling 14-day group, <sup>e</sup> $P<0.05$ ; compared with the modeling 21-day group, <sup>f</sup> $P<0.05$ (ANOVA, LSD-*t* test)

建模后 21 d 组角膜上皮排列规则,伤口区角膜前部胶原纤维排列紧密、较混乱,后部的胶原纤维疏松不规则(图 3G);建模后 30 d 组伤口区角膜前部胶原纤维排列紧密,角膜全层致密基质构成增加(图 3H)。建模后 5~14 d 组角膜上皮和基质间脱离,提示在初期上皮与基质粘连不牢固。

### 2.4 各组实验眼角膜超微结构表现

正常对照组兔角膜具有正常超微结构,包括 EBM 的致密层、透明层以及正常组织的角膜上皮和 ECM(图 4A);建模后 1 d 组角膜伤口区主要由纤维蛋白块填充,无上皮细胞和胶原纤维(图 4B);建模后 3 d 组伤口区可见松散的上皮细胞、纤维细胞生成,角膜基质无胶原纤维产生(图 4C);建模后 5 d 组伤口区有上皮细胞覆盖,上皮成纤维细胞增多(图 4D);建模后 7 d 组伤口区上皮和 ECM 可见明显的界限、肌成纤维细胞及少量的无序的 ECM 生成(图 4E);与建模



**图 3 各组兔眼角膜伤口区组织病理学表现** (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ , HE  $\times 100$ ) A: 正常对照组角膜上皮和基质均排列规整 B: 建模后 1 d 组伤口区由无细胞纤维斑块填充 C: 建模后 3 d 组伤口区少量单层上皮细胞沿纤维蛋白凝块表面生长 D: 建模后 5 d 组伤口区由多层上皮细胞和纤维蛋白块填充 E: 建模后 7 d 组伤口区上皮覆盖完整, 下方由纤维蛋白凝块、纤维细胞组成 F: 建模后 14 d 组角膜上皮厚度减小且更规整, 上皮由纤维细胞和不规则的 ECM 组成 G: 建模后 21 d 组角膜上皮排列规则, 角膜前部基质胶原纤维排列紧密, 后部的胶原纤维疏松不规则 H: 建模后 30 d 组伤口区角膜前部胶原纤维排列紧密, 致密的基质在全层中占比增加

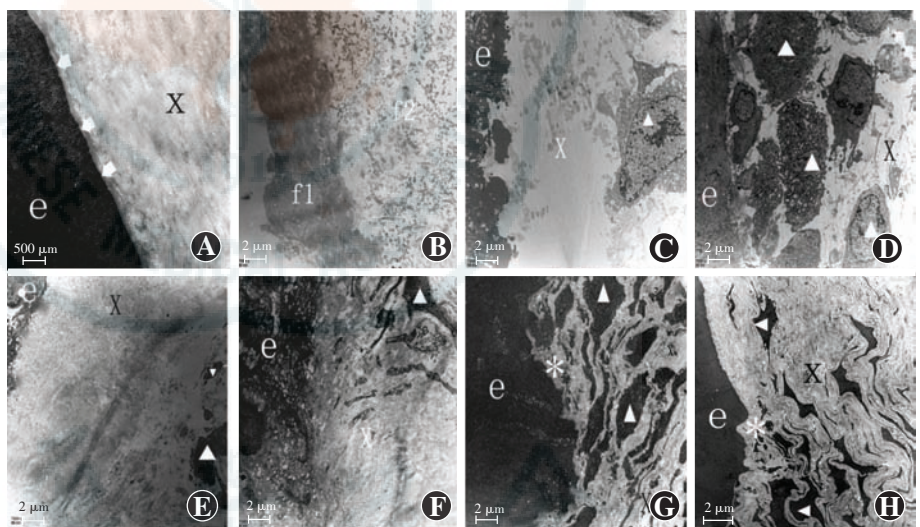
**Figure 3 Histopathology of corneal wound in different groups** (bar = 50  $\mu\text{m}$ , HE  $\times 100$ ) A: Corneal epithelium and stroma was regularly arranged in the normal control group B: In the modeling 1-day group, acellular fibrous plaque was found along the surface of the fibrin clot C: In the modeling 3-day group, a few of monolayer epithelial cells were found along the surface of the fibrin clot D: In the modeling 5-day group, the wound area was filled with separated layers of epithelial cells and fibrin blocks E: In the modeling 7-day group, wound area was full of fibrin clot and fibroblast with epithelium covered completely F: In the modeling 14-day group, corneal epithelium was denser, and fibroblast and disorder ECM were regular under the corneal epithelium G: In the modeling 21-day group, corneal epithelium arranged regularly, and collagenous fibers arranged tightly in the anterior stroma, but loosely and disorderly in the posterior stroma H: In the modeling 30-day group, collagenous fibers arranged tightly in the anterior stroma

后 7 d 组相比, 建模后 14 d 组伤口区可见更多上皮细胞覆盖、肌成纤维细胞, 有更多无序的 ECM 生成(图 4F); 建模后 21 d 组 EBM 不完全再生, 角膜上皮更致密, 产生层叠的纤维细胞, 细胞间存在大量无序的 ECM(图 4G); 建模后 30 d 组 EBM 不完全再生, 纤维细胞和 ECM 排列趋于与上皮平行(图 4H)。

### 3 讨论

角膜 EBM 位于基底上皮细胞和基质之间, 人妊娠 8~9 周可首先检测到, 妊娠后 14 个月角膜上皮与基质被连续的 EBM 所分离<sup>[8]</sup>。角膜 EBM 由胶原蛋白、层黏连蛋白、基底膜蛋白及巢蛋白所构成。透射电子显微镜下 EBM 主要由透明层和致密层组成<sup>[8]</sup>。研究表明, 基底膜是高度特化的 ECM, 形成薄的无细胞层, 是构成细胞的基础, 可将细胞与细胞分离并将细胞连接到间质基质<sup>[9]</sup>。

Fujikawa 等<sup>[10]</sup> 在 1984 年首次分析角膜 EBM 与外伤的关系,



**图 4 透射电子显微镜下各组兔眼角膜组织伤口区超微结构变化** A: 正常对照组上皮、EBM 和角膜基质均正常 (标尺 = 500  $\mu\text{m}$ ,  $\times 30\ 000$ ) B: 建模后 1 d 组可见纤维斑块填充 (标尺 = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) C: 建模后 3 d 组可见疏松上皮 (标尺 = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) D: 建模后 5 d 组成纤维细胞开始出现 (标尺 = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) E: 建模后 7 d 组分泌少量胶原纤维 (标尺 = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) F: 建模后 14 d 组可见胶原纤维增多 (标尺 = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) G: 建模后 21 d 组可见上皮致密, EBM 不完全再生, 产生大量无序的 ECM (标尺 = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) H: 建模后 30 d 组细胞外基质相对规整 (标尺 = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ )  $\square$ : 正常角膜 EBM; \* : 不完全再生 EBM;  $\Delta$ : 肌成纤维细胞; e: 角膜上皮; X: 角膜基质细胞外基质; f1: 纤维斑块; f2: 破碎的纤维蛋白

**Figure 4 Ultrastructural changes of the corneal wound area under transmission electron microscope in different group** A: The epithelium, EBM and corneal stroma were normal in the normal control group (bar = 500  $\mu\text{m}$ ,  $\times 30\ 000$ ) B: In the modeling 1-day group, wound was filled with fibrin clot (bar = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) C: Loose epithelium was observed in the modeling 3-day group (bar = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) D: Fibroblasts appeared in the modeling 5-day group (bar = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) E: A small amount of collagenous fibers were secreted in the modeling 7-day group (bar = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) F: More collagenous fibers were detected in the modeling 14-day group (bar = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) G: Dense epithelium, defective EBM regeneration and a large number of disordered ECM were observed in the modeling 21-day group (bar = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ ) H: ECM was well-organized in the modeling 30-day group (bar = 2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 7\ 000$ )  $\square$ : normal cornea EBM; \* : defective regeneration of EBM;  $\Delta$ : myofibroblast; e: corneal epithelium; X: corneal extracellular matrix; f1: fibrous plaque; f2: broken fibrin

他们通过透射电子显微镜和免疫荧光法验证了角膜上皮愈合与角膜 EBM 的关系,之后 Huh 等<sup>[11]</sup>提出角膜 EBM 与角膜损伤愈合纤维化有关,并采用免疫荧光法研究小鼠角膜穿通伤模型中层黏连蛋白的分泌和角膜基质纤维化的关系,依据组分生成来确定角膜 EBM 的再生。EBM 与角膜外伤后纤维化相关且影响成纤维细胞的生成。近年来 Torricelli 等<sup>[12]</sup>和 Marino 等<sup>[13]</sup>通过透射电子显微镜观察准分子激光角膜切削术 (photorefractive keratectomy, PRK) 模型中 EBM 再生,发现即使在生物分子学水平检测到 EBM 组分再生,但有时在形态学上也未能检测到完整的 EBM 结构。该研究发现矫正度数 -4.00 D PRK 术后 2 个月 EBM 完全再生,而矫正度数 -9.00 D PRK 术后需要 4 个月 EBM 才能完全再生。正常情况下 EBM 可通过其屏障功能调节肌成纤维细胞发育,防止角膜上皮分泌的转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 和其他因子渗透到基质中以驱动肌成纤维细胞发育,并且维持产生成熟的肌成纤维细胞的生存力<sup>[14]</sup>。研究表明,角膜创伤后如未及时治疗或者没有 EBM 再生, TGF- $\beta$  和血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 将以足够的浓度持续渗入角膜基质中,从而驱动成熟肌成纤维细胞的发育<sup>[15]</sup>。

角膜环钻损伤修复模型是角膜损伤修复研究公认的动物模型<sup>[11]</sup>, 1962 年开始用于角膜基质损伤愈合的研究,后期用于瘢痕的形成、角膜基质结构的变化和 TGF- $\beta$ 、PDGF 等因子分泌的研究,操作简单,可重复,并发症少,瘢痕组织形成量适中,适合于角膜纤维化的定性和定量分析。目前已有多种动物用于角膜伤口愈合模型研究,包括鸡、兔、小鼠、大鼠、犬和猫,每种动物都有其优势。兔角膜伤口愈合模型具有以下优势: (1) 兔角膜的大小、结构与人类角膜相似,操作更简单,可以使用与患者相同的评估工具和评估方法<sup>[16]</sup>; (2) 兔角膜具有良好表征的角膜伤口愈合反应,并且兔角膜和人类角膜损伤愈合的纤维化反应非常相似<sup>[13]</sup>。因此本实验选取兔为实验动物,观察角膜损伤后修复过程、角膜上皮再生过程、组织学改变、角膜混浊的形成、角膜各层的改变及 EBM 再生等指标,探讨在损伤修复早期角膜纤维化及其与 EBM 再生的关系。

本研究结果显示,兔眼角膜上皮损伤后逐渐再生,于建模后 21 d 完全上皮化,纤维斑块在建模后 20 min 形成,封闭伤口区形成前房;建模后 1 d 和 3 d,伤口区由无细胞的纤维斑块填充;建模后 5 d 和 7 d 由大量上皮细胞堆积在纤维斑块上,可见大量核深染的炎性细胞和纤维细胞迁移到纤维蛋白凝块中;建模后 14 d 纤

维斑块消失,由纤维细胞和 ECM 填充;建模后 21 d 及 30 d 修复的基质在全层中占比增加,提示建模后 21 d 角膜基质开始重塑。裂隙灯显微镜观察结果显示,建模后 1 d 伤口区由纤维斑块填充伤口区,角膜明显混浊,建模后 3 d 角膜纤维斑块变为半透明状,建模后 5 d 角膜伤口区纤维斑块逐渐由纤维细胞取代,角膜混浊逐渐加重,建模后 30 d 完全混浊。透射电子显微镜观察结果显示,角膜上皮化及 ECM 形成时间与前述指标变化时间吻合,建模后 5 d 可见纤维细胞在损伤区聚集,建模后 7 d 可见少量 ECM 生成,建模后 14 d 可见 ECM 生成增多,建模后 21 d 损伤区可见大量纤维细胞,建模后 30 d 可见纤维细胞和 ECM 与角膜上皮平行,但在建模后 21 d 和 30 d 角膜上皮与基质层之间 EBM 不完全再生。

本研究结果显示,兔角膜穿通伤后 21 d 角膜上皮完全愈合,EBM 不完全再生。角膜混浊于建模后 5 d 逐渐加重,至 30 d 达峰。角膜穿通伤的修复早期 (建模后 30 d) 启动角膜纤维过程,EBM 不完全再生。提示角膜基质纤维化在建模后 30 d 内持续进行,这可能是 EBM 不完全再生而导致其无法隔绝角膜上皮产生的细胞因子与基质细胞相互作用,从而启动角膜基质纤维化过程的原因。本研究可为角膜损伤后纤维化形成过程的临床研究提供思路。延长观察时间进行相应的分子生物学指标检测将是进一步研究工作的重点。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

## 参考文献

- [1] 袁检宝,李霞. 角膜损伤修复与基质重塑的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(4): 317-320. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 04. 018.  
Yuan JB, Li X. Advances in corneal wound healing and stroma remodeling[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36(4): 317-320. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 04. 018.
- [2] 刘蓓,张磊,刘玉震,等. 康柏西普对兔眼准分子激光角膜切削术后角膜上皮雾状混浊的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(2): 94-100. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 02. 005.  
Liu B, Zhang L, Liu YZ, et al. Effects of conbercept on haze formation after photorefractive keratectomy in rabbit eyes [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(2): 94-100. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 02. 005.
- [3] Wilson SE, Medeiros CS, Santiago MR. Pathophysiology of Corneal Scarring in Persistent Epithelial Defects After PRK and Other Corneal Injuries[J]. J Refract Surg, 2018, 34(1): 59-64. DOI: 10. 3928/1081597X-20171128-01.
- [4] Medeiros CS, Lassance L, Saikia P, et al. Posterior stromal cell apoptosis triggered by mechanical endothelial injury and basement membrane component nidogen-1 production in the cornea[J]. Exp Eye Res, 2018, 172: 30-35. DOI: 10. 1016/j. exer. 2018. 03. 025.
- [5] Cannon CJ, Meek KM. Organization of corneal collagen fibrils during the healing of trephined wounds in rabbits[J]. Wound Repair Regen, 2003, 11(1): 71-78. DOI: 10. 1046/j. 1524-475x. 2003. 11111. x.

- [6] Fantes FE, Hanna KD, Waring GO, et al. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys [J]. Arch Ophthalmol, 1990, 108(5): 665-675. DOI: 10.1001/archoph. 1990. 01070070051034.
- [7] Tandon A, Sharma A, Rodier JT, et al. BMP7 gene transfer via gold nanoparticles into stroma inhibits corneal fibrosis *in vivo* [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(6): e66434 [2013-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3682981/. DOI: 10.1371/journal.pone.0066434.
- [8] Torricelli AA, Singh V, Santhiago MR, et al. The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(9): 6390-6400. DOI: 10.1167/iovs.13-12547.
- [9] Seano G, Primo L. Podosomes and invadopodia: tools to breach vascular basement membrane [J]. Cell Cycle, 2015, 14(9): 1370-1374. DOI: 10.1080/15384101.2015.1026523.
- [10] Fujikawa LS, Foster CS, Gipson IK, et al. Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: immunofluorescence and ultrastructural studies [J]. J Cell Biol, 1984, 98(1): 128-138. DOI: 10.1083/jcb.98.1.128.
- [11] Huh MI, Kim YH, Park JH, et al. Distribution of TGF-beta isoforms and signaling intermediates in corneal fibrotic wound repair [J]. J Cell Biochem, 2009, 108(2): 476-488. DOI: 10.1002/jcb.22277.
- [12] Torricelli AA, Singh V, Agrawal V, et al. Transmission electron microscopy analysis of epithelial basement membrane repair in rabbit corneas with haze [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(6): 4026-4033. DOI: 10.1167/iovs.13-12106.
- [13] Marino GK, Santhiago MR, Santhanam A, et al. Regeneration of defective epithelial basement membrane and restoration of corneal transparency after photorefractive keratectomy [J]. J Refract Surg, 2017, 33(5): 337-346. DOI: 10.3928/1081597X-20170126-02.
- [14] Wilson SE. Coordinated modulation of corneal scarring by the epithelial basement membrane and descemet's basement membrane [J]. J Refract Surg, 2019, 35(8): 506-516. DOI: 10.3928/1081597X-20190625-02.
- [15] Medeiros CS, Marino GK, Santhiago MR, et al. The corneal basement membranes and stromal fibrosis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(10): 4044-4053. DOI: 10.1167/iovs.18-24428.
- [16] Stepp MA, Zieske JD, Trinkaus-Randall V, et al. Wounding the cornea to learn how it heals [J]. Exp Eye Res, 2014, 121: 178-193. DOI: 10.1016/j.exer.2014.02.007.

(收稿日期:2019-11-05 修回日期:2019-12-17)

(本文编辑:刘艳)

## · 病例报告 ·

## 眼型玫瑰痤疮诊疗一例

钟亚男<sup>1</sup> 方石峰<sup>2</sup> 林景荣<sup>2</sup> 马翔<sup>2</sup><sup>1</sup>大连医科大学附属第一医院皮肤科 116011; <sup>2</sup>大连医科大学附属第一医院眼科 116011

通信作者:方石峰, Email: stonecrest@sina.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.02.004

## Diagnosis and treatment of ocular rosacea: a case report

Zhong Yanan<sup>1</sup>, Fang Shifeng<sup>2</sup>, Lin Jingrong<sup>2</sup>, Ma Xiang<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China;<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China

Corresponding author: Fang Shifeng, Email: stonecrest@sina.com

患者,男,51岁,因双眼红肿伴异物感1周于2018年12月14日在大连医科大学附属第一医院眼科就诊。患者无高血压、糖尿病、心脏病等内科疾患史,吸烟史20年,现每天约10支,无饮酒史。否认过敏史及家族史。患者6年前无明显诱因于鼻部出现散在红斑、丘疹,无明显瘙痒,多种药膏(具体不详)外用皮疹可好转,但反复发作,面积渐扩大至双侧面部及眼周,伴烧灼感。1周前自觉双眼红肿不适及异物感。眼科检查:视力右眼1.0,左眼1.0;眼压右眼13 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),左眼12 mmHg;泪膜破裂时间(tear break-up time, BUT)右眼9 s,左眼10 s。双眼睑缘充血肥厚,睑缘无内外翻,双眼睑散在针尖大小丘疹、脓疱,分泌物增多,且上睑少量脱屑。裂隙灯显微镜检查可见双眼睑缘、结膜充血,右眼较重,右眼下方角膜基质铲形炎性浸润,左眼角膜透明,双眼前房中等深度, KP(-),房水闪烁(-),双眼瞳孔等大、正圆、居中,直径约3 mm,对光反射(+),双眼晶状体透明(图1)。双眼底检查未见明显异常。双

眼激光扫描共焦激光显微镜检查示双眼睑板腺开口缩小,未见虫体信号,双眼腺泡广泛纤维化、萎缩,双眼睫毛毛囊内见虫体信号,右眼查8根睫毛见4条虫体,左眼查8根睫毛见7条虫体(图2)。请皮肤科会诊,皮肤科查体:双侧面部、鼻部、上唇可见大面积水肿性红斑,界限清楚,其上可见散在粟粒至绿豆大小的丘疹、脓疱、油腻性鳞屑,皮温高(图3)。面部皮损毛囊蠕形螨阳性(图4)。临床诊断:眼型玫瑰痤疮。治疗:多西环素0.1 g口服,每日2次;复方甘草酸苷胶囊40 mg口服,每日3次;双氯芬酸钠滴眼液、加替沙星眼用凝胶点眼,每日4次;辅以质量分数0.75%甲硝唑凝胶面部皮损处外用。治疗后14 d,双眼睑缘充血水肿消退,丘疹及脓疱消退,结膜无明显充血,角膜透明(图5), BUT右眼16 s,左眼18 s。面部及鼻部红斑颜色变淡,脓疱消退,鳞屑明显减少,局部皮肤恢复正常,瘙痒及烧灼感消失(图6)。治疗后1个月,面部红斑进一步消退,眼部症状消失,未见复发。本例患者已签订肖像权使用同意书。