

· 实验研究 ·

锰离子滴眼液局部应用对眼前节组织的毒性作用

雷森 朱豫 梁申芝

450052 郑州大学第一附属医院眼科

通信作者:朱豫, Email:13673666718@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.008

【摘要】 **背景** 锰离子滴眼液用于活体视觉传导通路的示踪观察方法已有研究,但锰离子局部点眼对眼前节组织的毒性作用尚无深入研究。**目的** 研究不同质量浓度锰离子滴眼液对兔眼前节组织的毒性作用。**方法** 选取 32 只清洁级新西兰白兔,按照随机数字表法随机分为 1.00 mol/L MnCl₂ 组、0.50 mol/L MnCl₂ 组、0.25 mol/L MnCl₂ 组以及对照组,每组 8 只。采用抽签法随机选择动物一侧眼为实验眼,按照分组情况分别用 1.00、0.50、0.25 mol/L 锰离子滴眼液及生理盐水各 1 滴点于结膜囊中,分别于点眼后 2 h 及 1、3、7、14、21 和 28 d 时在裂隙灯显微镜下观察眼局部刺激反应;用角膜荧光素染色法观察角膜上皮损伤情况并进行评分;采用角膜内皮镜观察角膜内皮细胞密度(ECD)和角膜厚度,并于点眼后 3、7、14、28 d 行苏木精-伊红染色,检查结膜、角膜、小梁网及睫状体的组织病理学变化。**结果** 1.00 mol/L MnCl₂ 组和 0.50 mol/L MnCl₂ 组兔眼均出现睑结膜充血、水肿及大量分泌物等刺激症状,1.00 mol/L MnCl₂ 组兔眼于点眼后 1 d 刺激反应最强,点眼后 7 d 反应消失;0.50 mol/L MnCl₂ 组兔眼眼表刺激反应程度轻于 1.00 mol/L MnCl₂ 组,持续到点眼后 3 d;0.25 mol/L MnCl₂ 组兔眼点眼后未见明显的眼表刺激反应。点眼后 2 h、1 d、3 d 及 7 d,各组兔眼角膜上皮荧光素染色评分总体比较差异均有统计学意义($\chi^2 = 17.350、19.200、12.200、10.140$,均 $P < 0.05$)。各组兔眼点眼后不同时间点 ECD 总体比较差异无统计学意义($F_{\text{分组}} = 0.38, P > 0.05; F_{\text{时间}} = 1.79, P > 0.05$)。各组兔眼点眼后不同时间点角膜厚度总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 18.22, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 116.75, P < 0.05$)。点眼后 2 h~3 d,1.00 mol/L MnCl₂ 组兔眼角膜厚度值明显增加,但点眼后 7~28 d,各组兔眼角膜厚度值接近,点眼后 2 h~14 d 角膜厚度值均明显高于点眼后 28 d,0.50 mol/L MnCl₂ 组兔眼点眼后 2 h~1 d 角膜厚度值明显高于点眼后 28 d,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。组织病理学检查结果显示,1.00 mol/L MnCl₂ 组兔眼于点眼后 3 d 和 7 d 可见结膜、小梁网和睫状体的炎性细胞浸润及角膜基质水肿,0.50 mol/L MnCl₂ 组于点眼后 3 d 可见结膜炎性细胞浸润,但角膜、小梁网和睫状体组织未见明显异常,而 0.25 mol/L MnCl₂ 组兔眼点眼后结膜、角膜、小梁网和睫状体均未见明显异常。**结论** 1.00 mol/L 锰离子滴眼液对兔眼前节有明显毒性作用,0.50 mol/L 锰离子滴眼液的毒性则明显降低,0.25 mol/L 锰离子滴眼液对兔眼前节无明显的毒性作用。

【关键词】 锰化合物/应用 & 剂量; 滴眼液; 局部应用; 眼表; 眼前节; 毒性; 兔

Toxic effects of manganese ion eyedrops to ocular anterior segment Lei Miao, Zhu Yu, Liang Shenzhi

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Zhu Yu, Email:13673666718@163.com

【Abstract】 **Background** A preliminary study determined an application of manganese ion eyedrops in tracing observation of visual system *in vivo*, but whether manganese ion has toxic effects on ocular anterior segment tissues is still unclear. **Objective** This study was to investigate the toxic effects of different concentrations of manganese ion eyedrops on ocular anterior segment tissues. **Methods** Thirty-two clean New-Zealand white rabbits were divided into 1.00 mol/L MnCl₂ group, 0.50 mol/L MnCl₂ group, 0.25 mol/L MnCl₂ group and normal control group according to random number table. The experimental eye was randomly chosen from each rabbit for eyedrops application. The manganese ion eyedrops at concentration of 1.00 mol/L, 0.50 mol/L or 0.25 mol/L was topically administered in any lateral eye of each rabbit in the 1.00 mol/L MnCl₂ group, 0.50 mol/L MnCl₂ group, 0.25 mol/L MnCl₂ group, and normal saline solution was used in the same way in the normal control group. In 2 hours, 1 day and 3, 7, 14, 21, 28 days after eyedrops application, the irritative response of ocular surface was examined under the slit lamp microscope, and corneal damage was evaluated by corneal fluorescence staining, and corneal endothelial cell density (ECD) and corneal thickness were assessed using corneal specular microscope. The eyeball samples were prepared in 3, 7, 14 and 28 days after eyedrops application and hematoxylin and eosin staining was performed for

histopathological examination of conjunctiva, cornea, trabecular meshwork and ciliary body tissue. The use and care of experimental animals complied with the Statement of ARVO. **Results** Severe hyperemia and edema in palpebral conjunctiva appeared in the 1.00 mol/L MnCl₂ group and 0.50 mol/L MnCl₂ group, and the symptoms reached a maximum level 1 day after eyedrop application and disappeared 7 days after eyedrops application in the 1.00 mol/L MnCl₂ group. These symptoms were milder in the 0.50 mol/L MnCl₂ group in comparison with the 1.00 mol/L MnCl₂ group. There were no ocular irritative response in the 0.25 mol/L MnCl₂ group. Significant differences were found in the corneal fluorescence scores among the groups 2 hours, 1 day, 3 and 7 days after eyedrop application ($\chi^2 = 17.350, 19.200, 12.200, 10.140$, all at $P < 0.05$), with the highest score in the 1.00 mol/L MnCl₂ group. The ECD was not significantly different among the groups and different time points ($F_{\text{group}} = 0.38, P > 0.05; F_{\text{time}} = 1.79, P > 0.05$). The corneal thickness value was significantly different among the groups and different time points ($F_{\text{group}} = 18.22, P < 0.05; F_{\text{time}} = 116.75, P < 0.05$). The corneal thickness value was elevated during 2 hours to 3 days after administration of eyedrops in the 1.00 mol/L MnCl₂ group and closed to normal from 7 days to 28 days. The corneal thickness value was higher from 2 hours to 14 days than that in 28 days after administration of eyedrops in the 1.00 mol/L MnCl₂ group, and the corneal thickness value was higher in 2 hours to 1 day than that in 28 days after administration of eyedrops in the 0.50 mol/L MnCl₂ group (all at $P < 0.05$). Inflammatory cell infiltration and stromal edema were exhibited in conjunctival, trabecular meshwork and ciliary body tissue in the 1.00 mol/L MnCl₂ group 3 days and 7 days after eyedrops application, and only inflammatory cell infiltration in conjunctival tissue in the 0.50 mol/L MnCl₂ group 3 days after eyedrops application. No obvious abnormality was seen in the 0.25 mol/L MnCl₂ group.

Conclusions 1.00 mol/L manganese ion eyedrops has a remarkable toxic effect on ocular anterior segment tissue in rabbit. With the lowering of drug concentrations, the toxic effects were reduced. The manganese-enhanced MRI using 0.25 mol/L manganese ion eyedrops is feasibility because of its non-toxicity to ocular tissues.

[Key words] Manganese compounds/administration & dosage; Eye drops; Administration, topical; Ocular surface; Anterior segment; Toxicity; Rabbits

MRI是检查视神经及球后组织解剖结构首选的影像学方法,但是由于视神经直径较细、结构复杂,其走行于狭小的视神经管骨性空间内,视神经 MRI 检查时受周围的窦腔结构、眶脂肪及眼球运动的影响,成像时容易形成化学位移及运动伪影^[1]。近年的研究发现,锰离子增强 MRI 成像可用于活体视觉传导通路的示踪观察^[2-3],目前已有研究者报道了玻璃体腔注射锰离子增强 MRI 成像方法^[4],但该方法为一种有创的检查方法,增加了眼内感染的风险。因此,增强 MRI 的视神经影像学检查的研究正聚焦于锰离子溶液点眼法的可行性^[5],但锰离子滴眼液局部点眼是否对眼表及眼前节产生毒性作用尚不清楚。本研究中拟观察不同浓度的锰离子滴眼液局部应用对兔眼眼前节组织的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年清洁级新西兰白兔 32 只,由河南省实验动物中心提供,体质量 2.0 ~ 2.5 kg,雌雄不限。所有实验兔均行裂隙灯显微镜检查以排除眼部疾病。实验动物的使用、饲养及处死方法均遵循美国视觉与眼科研究协会制定的科研动物使用规范,本研究方案经郑州大学第一附属医院医学科伦理委员会审核通过(2014 科研第 45 号)。

1.1.2 主要试剂及仪器 纯度为 99% 的 MnCl₂ · 4H₂O (美国 Alfa Aesar 公司); 1.00、0.50 和 0.25 mol/L 锰离子高渗滴眼液, pH 分别为 4.93、5.26、5.48 (河南省眼科研究所新鲜配制); 质量分数 10% 荧光素钠注射液(美国 Alcon 公司)。SP-3000P 角膜内皮细胞计(日本 Topcon 公司); BX900 裂隙灯显微镜(瑞士 HAAG-STREIT 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将 32 只新西兰白兔按随机数字表法随机分为 1.00 mol/L MnCl₂ 组、0.50 mol/L MnCl₂ 组、0.25 mol/L MnCl₂ 组和对照组,每组 8 只。采用抽签法随机选取一侧眼作为实验眼,根据分组分别于结膜囊内点 1 滴 1.00、0.50、0.25 mol/L 的 MnCl₂ 滴眼液,对照组兔眼等容量生理盐水点眼。

1.2.2 眼局部刺激反应评价 参照眼表刺激反应评分标准^[6],分别于给药后 2 h 及 1、3、7、14、21 和 28 d 于裂隙灯显微镜下观察眼局部刺激反应。按计分标准记录兔眼的眼睑瞬目运动评分(0 ~ 1 分)、眼睑痉挛评分(0 ~ 1 分)、有无畏光或流泪评分(0 ~ 2 分)、角膜混浊评分(0 ~ 4 分)、虹膜充血及对光反射评分(0 ~ 2 分)、结膜充血评分(0 ~ 3 分)及水肿评分(0 ~ 4 分)、分泌物评分(0 ~ 4 分),各分值相加得到总评分,除以受试动物数,得到眼表刺激反应的平均分值和刺激程度。

1.2.3 角膜荧光素染色法观察角膜上皮损伤情况

10% 荧光素钠注射液用生理盐水 5 倍稀释后点眼 1 滴,然后用生理盐水冲洗干净,于裂隙灯显微镜钴蓝光下观察并拍照。将角膜分为 4 个象限,每个象限按荧光素染色程度进行评分,无染色者为 0 分,分散点状染色者为 1 分,成群点状染色者为 2 分,成片状染色者为 3 分,4 个象限总评分为 0~12 分。

1.2.4 角膜内皮镜测定角膜内皮细胞数及角膜厚度
采用 SP-3000P 角膜内皮细胞计测定并记录兔眼角膜内皮细胞密度 (corneal endothelial density, ECD) 和角膜厚度。

1.2.5 眼前节组织的组织病理学检查 各组分别于点眼后 3、7、14、28 d 任意处死 2 只实验兔。摘除眼球,剪取部分结膜组织,体积分数 10% 甲醛固定液固定,24 h 后解剖显微镜下将眼球的筋膜组织剪除并沿眼球水平的正中线剖开眼球,取角膜、小梁网及睫状体,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,4 μm 厚切片。石蜡切片脱蜡至水化,苏木素-伊红染色,光学显微镜下观察角膜、结膜、小梁网及睫状体的形态学变化。

1.3 统计学方法

采用 SAS 9.13 统计学软件进行统计分析,本研究中 ECD 及角膜厚度测定的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;眼表刺激反应评分及角膜荧光素染色评分数据呈非正态分布,以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。采用完全随机分组多水平实验设计,各组兔眼点眼后不同时间点眼表刺激反应评分及角膜荧光素染色评分的总体比较采用 Frideman 检验,多重比较采用校正检验水准的 Bonferroni 检验;各组兔眼点眼后不同时间 ECD 及角膜厚度值的总体比较采用重复测量两因素方差分析,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 各组兔眼眼表刺激反应评分比较

1.00 mol/L MnCl₂ 组兔眼点眼后瞬目运动增加,眼睑痉挛,同时出现结膜混合充血、角膜上皮水肿、结膜囊分泌物增多等刺激反应,刺激症状在点眼后 1 d 最为严重,随后逐渐减轻,于点眼后 7 d 消失;0.50 mol/L MnCl₂ 组兔眼点眼后也出现上述刺激症状,但反应程度较 1.00 mol/L MnCl₂ 组轻,并于点眼后 3 d 基本恢复正常;0.25 mol/L MnCl₂ 组兔眼点眼后未见明显的眼表刺激反应(表 1,图 1)。

2.2 各组兔眼角膜上皮损伤评分

各组间兔眼点眼后 2 h、1 d、3 d 及 7 d 角膜上皮荧光素染色评分总体比较差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 17.350、19.200、12.200、10.140$, 均 $P < 0.05$), 1.00 mol/L MnCl₂ 组兔眼角膜上皮可见明显荧光素染色,角膜上皮损害,点眼后 1 d 荧光素染色程度最强,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随后逐渐减弱,点眼后 14 d 荧光素染色基本消失;0.50 mol/L MnCl₂ 组兔眼角膜上皮荧光素染色程度较轻,点眼后 3 d 荧光素染色基本消失;0.25 mol/L MnCl₂ 组兔眼上皮荧光素染色程度较轻,点眼后 3 d 荧光素染色基本消失,以上各时间点角膜荧光素染色评分与对照组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 2)。

表 1 各组兔眼不同时间点眼表刺激反应评分 [$M(Q_1, Q_3)$]

组别	不同时间点兔眼眼表刺激反应评分						
	2 h (n=8)	1 d (n=8)	3 d (n=8)	7 d (n=6)	14 d (n=4)	21 d (n=2)	28 d (n=2)
1.00 mol/L MnCl ₂ 组	7.0(6.0,8.0)	11.0(10.0,12.0)	5.0(4.0,6.0)	1.5(1.2,1.7)	2.5(2.0,3.0)	1.0(1.0,1.0)	1.0(1.0,1.0)
0.50 mol/L MnCl ₂ 组	5.0(4.0,6.0)	5.5(4.5,6.5)	2.5(1.5,3.5)	1.0(0.5,1.5)	1.0(0.5,1.5)	1.0(1.0,1.0)	1.0(1.0,1.0)
0.25 mol/L MnCl ₂ 组	3.0(2.0,4.0)	2.0(1.0,3.0)	1.0(0.5,1.5)	0.5(0.2,0.7)	1.0(0.5,1.5)	1.0(1.0,1.0)	0.5(0.2,0.7)
对照组	1.0(0.5,1.5)	0.5(0.2,0.7)	0.0(0.0,0.0)	0.5(0.2,0.7)	0.5(0.2,0.7)	1.0(1.0,1.0)	0.5(0.2,0.7)
χ^2	25.060	27.980	22.630	7.320	5.790	3.000	2.330
<i>P</i>	<0.000	<0.000	<0.000	0.063	0.123	0.392	0.506

(Frideman 检验)

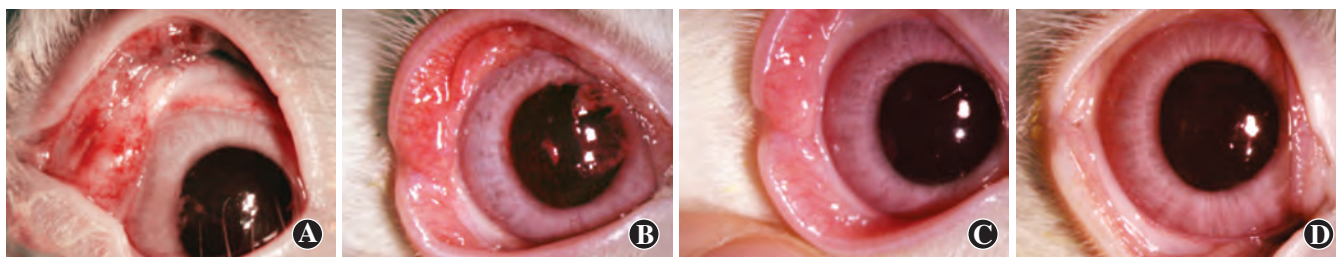


图 1 各组兔眼眼表刺激反应情况 A:1.00 mol/L MnCl₂ 组兔眼眼睑及结膜严重肿胀,结膜明显充血,分泌物增多 B:0.50 mol/L MnCl₂ 组兔眼眼睑及结膜严重肿胀及充血,分泌物增多,但症状较 1.00 mol/L MnCl₂ 组轻 C:0.25 mol/L MnCl₂ 组兔眼眼睑轻度水肿,未见充血 D:对照组兔眼眼睑及结膜无水肿

表 2 各组兔眼不同时间点角膜荧光素染色评分比较 [M(Q₁, Q₃)]

组别	点眼后不同时间点角膜荧光素染色评分						
	2 h (n=8)	1 d (n=8)	3 d (n=8)	7 d (n=6)	14 d (n=4)	21 d (n=2)	28 d (n=2)
1.00 mol/L MnCl ₂ 组	4.0(3.5, 4.5) ^a	5.0(4.2, 4.7) ^a	2.5(2.2, 2.7) ^a	2.0(1.5, 2.5) ^a	1.0(0.5, 2.5)	0.5(0.2, 0.7)	0.0(0.0, 0.0)
0.50 mol/L MnCl ₂ 组	2.0(1.5, 2.5) ^a	3.0(2.5, 3.5) ^a	1.0(0.5, 1.5)	0.5(0.2, 0.7)	0.0(0.2, 0.7)	0.0(0.0, 0.0)	0.0(0.0, 0.0)
0.25 mol/L MnCl ₂ 组	1.0(0.5, 1.5)	1.0(0.5, 1.5)	1.0(0.5, 1.5)	0.0(0.2, 0.7)	1.0(1.0, 1.0)	0.5(0.2, 0.7)	0.5(0.2, 0.7)
对照组	1.0(1.2, 1.7)	1.0(0.5, 1.5)	1.0(0.5, 1.5)	0.5(0.5, 1.5)	1.0(0.2, 0.7)	0.0(0.0, 0.0)	0.5(0.2, 0.7)
χ ²	17.350	19.200	12.200	10.140	4.170	3.820	3.430
P	0.001	0.000	0.007	0.017	0.243	0.282	0.330

注:与各自的对照组比较,^aP<0.05(Friedman 秩和检验, Bonferroni 检验)

2.3 各组兔眼 ECD 和角膜厚度比较

点眼后 1 d, 各组角膜内皮细胞形态均无明显变化(图 2)。各组间兔 ECD 总体比较差异无统计学意义(F_{分组} = 0.38, P>0.05); 不同时间点间 ECD 总体比较差异无统计学意义(F_{时间} = 1.79, P>0.05)(表 3)。各组间兔眼角膜厚度总体比较差异有统计学意义(F_{分组} = 18.22, P<0.05), 点眼后 2 h ~ 3 d, 1.00 mol/L MnCl₂ 组

兔眼角膜厚度值明显增加, 但点眼后 7 ~ 28 d, 各组兔眼角膜厚度值接近; 不同时间点间角膜厚度总体比较差异有统计学意义(F_{时间} = 116.75, P<0.05), 其中 1.00 mol/L MnCl₂ 组兔点眼后 2 h ~ 14 d 角膜厚度值均明显高于点眼后 28 d, 而 0.50 mol/L MnCl₂ 组兔点眼后 2 h ~ 1 d 角膜厚度值明显高于点眼后 28 d, 差异均有统计学意义(均 P<0.05)(表 4)。

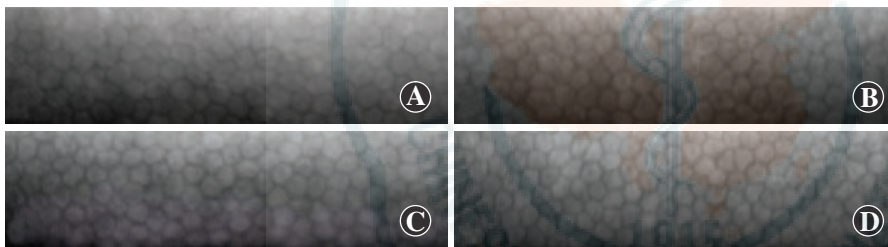


图 2 各组兔眼点眼后 1 d 角膜内皮形态观察 A: 1.00 mol/L MnCl₂ 组 B: 0.50 mol/L MnCl₂ 组 C: 0.25 mol/L MnCl₂ 组 D: 对照组 各组角膜内皮细胞形态多呈六边形, 排列紧密

表 3 各组兔眼点眼后不同时间点 ECD 比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/mm²)

组别	点眼后不同时间点兔眼 ECD						
	2 h (n=8)	1 d (n=8)	3 d (n=8)	7 d (n=6)	14 d (n=4)	21 d (n=2)	28 d (n=2)
1.00 mol/L MnCl ₂ 组	2 696.3 ± 184.9	2 891.6 ± 204.8	2 792.1 ± 257.4	2 750.1 ± 258.6	2 946.9 ± 166.8	2 904.6 ± 108.7	2 811.8 ± 109.3
0.50 mol/L MnCl ₂ 组	2 840.9 ± 119.7	2 862.7 ± 198.7	2 846.2 ± 124.5	2 726.2 ± 155.8	2 834.9 ± 186.2	2 894.8 ± 231.5	2 845.2 ± 126.7
0.25 mol/L MnCl ₂ 组	2 707.6 ± 156.7	2 872.9 ± 142.2	2 792.6 ± 202.6	2 771.9 ± 198.7	2 905.3 ± 125.0	2 871.3 ± 93.6	2 832.8 ± 74.9
对照组	2 779.8 ± 139.4	2 885.6 ± 135.6	2 827.9 ± 150.5	2 727.6 ± 138.6	2 820.0 ± 189.8	2 836.4 ± 108.9	2 858.7 ± 97.5

注: F_{分组} = 0.38, P>0.05; F_{时间} = 1.79, P>0.05 (重复测量两因素方差分析) ECD: 角膜内皮细胞密度

表 4 各组兔眼点眼后不同时间点角膜厚度比较 ($\bar{x} \pm s$, mm)

组别	点眼后不同时间点兔眼角膜厚度						
	2 h (n=8)	1 d (n=8)	3 d (n=8)	7 d (n=6)	14 d (n=4)	21 d (n=2)	28 d (n=2)
1.00 mol/L MnCl ₂ 组	0.328 ± 0.007 ^{ab}	0.403 ± 0.007 ^{ab}	0.345 ± 0.018 ^{ab}	0.332 ± 0.018 ^b	0.321 ± 0.007 ^b	0.319 ± 0.006	0.317 ± 0.004
0.50 mol/L MnCl ₂ 组	0.328 ± 0.007 ^{ab}	0.330 ± 0.009 ^b	0.322 ± 0.009	0.322 ± 0.004	0.325 ± 0.010	0.318 ± 0.007	0.318 ± 0.008
0.25 mol/L MnCl ₂ 组	0.319 ± 0.005	0.321 ± 0.004	0.322 ± 0.003	0.322 ± 0.002	0.320 ± 0.003	0.320 ± 0.003	0.321 ± 0.003
对照组	0.319 ± 0.005	0.321 ± 0.004	0.322 ± 0.003	0.322 ± 0.002	0.320 ± 0.002	0.320 ± 0.002	0.321 ± 0.002

注: F_{分组} = 18.22, P<0.000; F_{时间} = 116.75, P<0.000. 与各自对照组比较,^aP<0.05; 与各自组内点眼后 28 d 值比较,^bP<0.05 (重复测量两因素方差分析, LSD-t 检验)

2.4 各组兔眼眼前节组织病理学表现

点眼后 3 d 可见 1.00 mol/L MnCl₂ 组兔眼结膜组织水肿、血管扩张和炎性细胞浸润, 炎性细胞主要包括中性粒细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞, 此外可见角膜上皮和基质层水肿、基底细胞体积增大及小梁网和睫状体组织的炎性细胞浸润。点眼后 7 d 上述表现较点眼后 3 d

轻。点眼后 14 d, 兔眼结膜、角膜、小梁网和睫状体组织接近正常。0.50 mol/L MnCl₂ 组兔眼点眼后 3 d 可见结膜组织水肿、血管扩张以及炎性细胞浸润, 角膜、小梁网和睫状体组织未见明显异常, 点眼后 7 d, 兔眼结膜未见明显异常(图 3)。0.25 mol/L MnCl₂ 组兔眼点眼后各时间点结膜、角膜、小梁网和睫状体组织形态均未见明显异常。

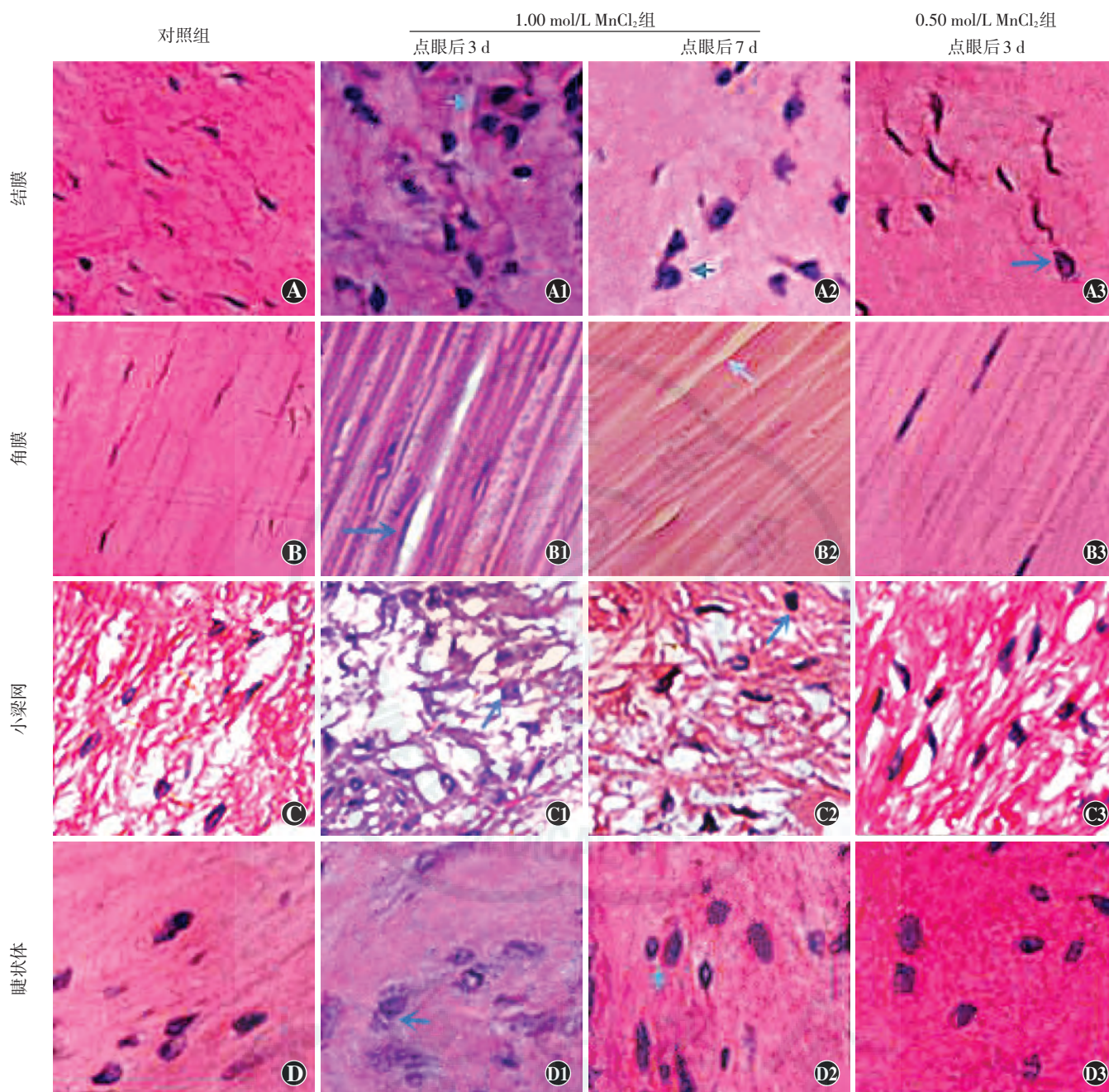


图 3 各组兔眼点眼后不同时间点眼前节组织病理学结果(HE ×400) 正常兔眼结膜、角膜、小梁网和睫状体组织未见明显改变(A、B、C、D); 1.00 mol/L MnCl₂组点眼后 3 d 兔眼结膜、小梁网和睫状体均可见明显的炎性细胞浸润(A1、C1、D1)(箭头)和角膜基质层明显水肿(B1)(箭头); 1.00 mol/L MnCl₂组点眼后 7 d 可见结膜、小梁网和睫状体组织中少量炎性细胞浸润(A2、C2、D2)(箭头)和角膜基质层轻度水肿(B2)(箭头); 0.50 mol/L MnCl₂组点眼后 3 d,兔眼结膜可见少量炎性细胞浸润(A3)(箭头),但角膜、小梁网和睫状体组织接近正常(B3、C3、D3)

3 讨论

3.1 锰离子滴眼液点眼行视神经成像和神经示踪的意义

以往视神经损伤和再生研究中所应用的神经示踪技术都必须将动物处死后再进行观察,缺乏无创的活体观察神经轴浆流和突触传递动态过程的技术。近年来,锰离子神经示踪剂结合 MRI 技术为活体视神经动

态观察带来了希望,其基本原理是锰离子通过竞争 Ca²⁺通道而替代 Ca²⁺在神经细胞内随轴浆流运动和神经细胞突触间传递,且因为锰离子的顺磁性作用,能使 T1 加权 MRI 信号强度增加,从而可以在 MRI 影像上清晰显示视神经的轮廓、视网膜神经节细胞轴浆流的运行以及整个视觉传导通路的情况^[7]。多项研究证实,锰离子滴眼液点眼后透过角膜屏障渗入前房,在眼内被视网膜神经节细胞摄取^[8],随轴浆流运行到外侧

膝状体,并可跨神经元达到视觉皮质,从而显示视路传导情况。采用 3.0T MRI 扫描仪,用 0.50 mol/L $MnCl_2$ 局部点眼后兔眼视觉通路未见明显增强,1.00 mol/L^[8] 和 1.50 mol/L $MnCl_2$ 点眼后兔眼视觉通路均可见明显增强,但本研究显示 1.00 mol/L $MnCl_2$ 点眼后即出现眼表刺激症状,因此 1.00 mol/L 和 1.50 mol/L $MnCl_2$ 点眼的临床应用受限。

3.2 锰离子的生理作用和毒理作用

作为人体内必需的微量元素,锰离子可以防止脂质微粒体和自由基的过氧化^[9-10],对细胞有重要的保护作用,但当生物体内锰离子浓度过高时会造成组织的急性或慢性毒性反应^[11-12]。目前认为锰离子产生细胞毒性作用的机制可能有:(1)可导致细胞膜结构和功能的改变。(2)引起神经细胞内 Ca^{2+} 平衡的失调。(3)损伤细胞线粒体功能,影响能量代谢。(4)刺激小胶质细胞和星形细胞合成过量一氧化氮。(5)由自由基介导的神经细胞变性^[13]。因此,使用锰离子滴眼液用于人的视神经功能性成像诊断和视觉传导观察,须首先观察其对眼表和视觉传导通路的安全性。

3.3 锰离子滴眼液对眼表的刺激和眼前节的损害

本研究中发现,1.00 mol/L $MnCl_2$ 对眼表的刺激反应比较强烈,局部应用后出现了较重的结膜充血水肿、分泌物增加、角膜水肿和角膜上皮细胞损伤,但其对角膜内皮细胞未产生明显毒性作用。组织病理学结果显示,实验眼局部点用 1.00 mol/L $MnCl_2$ 滴眼液后结膜、小梁网和睫状体出现炎性细胞浸润和角膜基质水肿等可逆性改变,推测锰离子除自身生物毒性外,其高渗性也可能是导致眼前节损害的主要原因。此外, $MnCl_2$ 滴眼液的 pH 值、滴眼液颗粒大小也有一定的影响。为防止锰离子反应沉淀,滴眼液配制中未加入缓冲溶液调节其 pH 值。正常人眼可耐受的 pH 值为 5.0~9.0, pH 值为 6.0~8.0 时无不适感。0.50 mol/L $MnCl_2$ 滴眼液点眼时兔眼也出现了眼表刺激反应,结膜和角膜上皮有轻度损害,角膜基质层水肿,但程度较轻;锰离子浓度为 0.25 mol/L 时,兔眼前节组织均未出现明显的眼表刺激反应。

综上所述,1.00 mol/L 和 0.50 mol/L 锰离子滴眼剂对眼前节组织有较大的生物毒性,而 0.25 mol/L 锰离子滴眼液无明显的眼表刺激和眼前节的毒性作用。目前,我们正在开展低浓度 $MnCl_2$ 多次点眼的给药方式进行视觉系统锰离子增强 MRI 可行性的研究,以期作为 $MnCl_2$ 点眼联合锰离子增强 MRI 寻找一种更为安全、有效的给药方式。锰离子渗透到眼内的最低有效浓度、使用方法和频次、眼内弥散或扩散途径等情况均

有待于进一步研究,从而实现锰离子点眼结合活体视神经 MRI 功能成像,用于视神经疾病诊断和视觉传导通路的观察。

参考文献

- [1] 梁中芝,朱豫,杨子涛,等.兔视神经磁共振成像与大体解剖的对照分析[J].郑州大学学报:医学版,2014,49(6):856-859. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2014.06.024.
Liang SZ, Zhu Y, Yang ZT, et al. Comparative study of MRI and gross anatomy of rabbit optic nerve[J]. J Zhengzhou Univ Med Sci, 2014, 49(6): 856-859. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2014.06.024.
- [2] Yamada M, Momoshima S, Masutani Y, et al. Diffusion-tensor neuronal fiber tractography and manganese-enhanced MR imaging of primate visual pathway in the common marmoset: preliminary results [J]. Radiology, 2008, 249(3): 855-864. DOI:10.1148/radiol.2493072141.
- [3] 王玮玲,徐辉,胡运韬,等. Mn^{2+} 在活体眼增强磁共振视路示踪成像的量效和时效关系研究[J].中华实验眼科杂志,2011,29(7):585-590. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.07.003.
Wang WL, Xu H, Hu YT, et al. Study of Mn^{2+} -enhanced magnetic resonance imaging for optic visual pathway *in vivo* [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(7): 585-590. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.07.003.
- [4] Chan KC, Li J, Kau P, et al. *In vivo* retinotopic mapping of superior colliculus using manganese-enhanced magnetic resonance imaging [J]. Neuroimage, 2011, 54(1): 389-395. DOI:10.1016/j.neuroimage.2010.07.015.
- [5] Sun SW, Campbell B, Lunderville C, et al. Noninvasive topical loading for manganese-enhanced MRI of the mouse visual system [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(6): 3914-3920. DOI:10.1167/iov.10-6363.
- [6] 殷莉莉,袁振丽,郝冬海,等.拉坦前列素脂质体滴眼液的眼表毒性[J].沈阳药科大学学报,2014,31(8):634-638.
- [7] 王玮玲,徐辉,胡运韬,等.二价锰离子增强磁共振视神经活体示踪的实验研究[J].中华眼底病杂志,2010,26(4):386-388. DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2010.04.24.
- [8] Liang S, Liang M, Zhu Y, et al. The distribution of Mn^{2+} in rabbit eyes after topical administration for manganese-enhanced MRI [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(1): 836-841.
- [9] Chang EC, Kosman DJ. Intracellular Mn (II)-associated superoxide scavenging activity protects Cu, Zn superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* against dioxygen stress [J]. J Biol Chem, 1989, 264(21): 12172-12178.
- [10] Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization [J]. J Biol Chem, 1973, 248(13): 4793-4796.
- [11] Lucchini R, Albin E, Placidi D, et al. Brain magnetic resonance imaging and manganese exposure [J]. Neurotoxicology, 2000, 21(5): 769-775.
- [12] London RE, Toney G, Gabel SA, et al. Magnetic resonance imaging studies of the brains of anesthetized rats treated with manganese chloride [J]. Brain Res Bull, 1989, 23(3): 229-235.
- [13] 王玮玲,马志中,李颖,等.锰离子对兔眼视网膜毒性的形态学研究[J].宁夏医科大学学报,2013,35(1):4-8,封2. DOI:10.3969/j.issn.1674-6309.2013.01.002.
Wang WL, Ma ZZ, Li Y, et al. Toxicity of manganese on rabbit retina [J]. J Ningxia Med Univ, 2013, 35(1): 4-8, cover 2. DOI:10.3969/j.issn.1674-6309.2013.01.002.

(收稿日期:2016-03-20)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)