

# 糖皮质激素性青光眼小梁细胞超微结构的改变

## Ultrastructural Changes of the Trabecular Meshwork in Glucocorticoid Induced Glaucoma

赵 静 张 琦

辽宁医学院附属第一医院眼科, 锦州 121000

Jing Zhao, Qi Zhang

The department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, China

目的:制作兔糖皮质激素性青光眼动物模型,观察小梁细胞超微结构的改变,探讨激素性青光眼房水排出阻力增加的机制。

方法:40只新西兰大白兔,随机分为4组,正常对照组(10只)、单独滴地塞米松组(10只)、单独注射曲安奈德组(10只)和联合用药组(10只)。实验前连续3天于每日8、10和12 am用Schiotz's眼压计测量眼压后取平均值,最后取得兔基础眼压值。实验正式开始后,正常对照组用无菌生理盐水滴兔双眼,每日3次;单独滴地塞米松组用0.5%地塞米松磷酸钠溶液滴兔双眼,每日3次,持续8周;单独注射曲安奈德组每周球结膜下注射曲安奈得1次(3 mg),持续8周;联合用药组用0.5%地塞米松磷酸钠溶液滴兔双眼,每日3次,持续8周,每周球结膜下注射曲安奈得1次(3 mg)。用药开始后,第4天开始每7日用Schiotz's眼压计监测一日4组眼压(分别于8、10和12 am测一次眼压后取平均值),将眼内压 $\geq 21.975$  mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)并持续1周者纳入诱发成功模型。8周后取四组兔双眼标本,做成电镜超薄切片用于电镜研究。

结果:1.兔基础眼压为(18.082 $\pm$ 2.398)mm Hg( $n=80$ ),联合用药组兔2~3周眼压开始升高,第3周时升高到(24.065 $\pm$ 1.245)mm Hg, $P<0.05$ ,具有统计学意义,随后眼压逐渐升高,第6周达到峰值,眼压升高到(30.214 $\pm$ 0.766)mm Hg,第8周兔眼压为(29.144 $\pm$ 0.685)mm Hg, $P<0.05$ 。联合用药组兔20只眼16只眼压升高,眼压升高率为80%。正常对照组兔眼压(18.254 $\pm$ 3.465)mm Hg无升高。其余两组兔眼压虽有所升高,但升高不稳定,持续时间小于1周,未达到高眼压模型标准。2.联合用药组兔小梁细胞核异形性增大,细胞间质微丝微管结构增多,胞浆空泡变性,粗面内质网扩张,以及细胞间无定形物质增多。

结论:1.联合用药组成功地建立了兔糖皮质激素性高眼压模型,其余3组未能成功建立兔糖皮质激素性高眼压模型。2.电镜下观察到的细胞骨架所发生一系列改变,是糖皮质激素诱导眼压升高的重要环节。 *眼科学报* 2010;25:119-124.

关键词:糖皮质激素;青光眼;小梁细胞;超微结构

**Purpose:** Steroid-induced glaucoma in rabbit ocular was established to observe the ultrastructural changes in trabecular meshwork, and to preliminarily study the mechanisms of increased resistance of aqueous outflow in steroid-induced glaucoma.

**Methods:** Forty New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups, namely, control group ( $n=10$  rats), drops drug group ( $n=10$  rats), injecting drug group ( $n=10$  rats) and drug combination group ( $n=10$  rats). For three consecutive days before the experiment, using the Schiotz's tonometer to measure intraocular pressure (IOP) at 8 am, 10 am, 12 am each day, for the average value, finally obtained these

rabbits' basis IOP. The Drug combination group of rabbit eyes were treated with dexamethasone sodium phosphate solution (0.5%) for 8 weeks, three times a day, and injected triamcinolone endure (3 mg) weekly. While the control group of rabbit eyes were treated with sterile saline in the same period of experiment. After 4 days, these IOP of rabbit was measured by Schiotz's tonometer weekly (got the IOP at 8 am, 10 am, and 12 am each day, then taken after the average value). The rabbit with IOP were more than 21.97 mm Hg and continued for one week was regarded as a successful animal model as Corticosteroid. After 8 weeks, the eyes of control group and Corticosteroid rabbits were made for transmission electron microscopy (TEM) specimen to study the ultrastructure of trabecular meshwork cell.

**Results:** 1. The rabbit-based IOP was  $(18.082 \pm 2.398)$  mm Hg ( $n=80$ ), in the drug combination group. The IOP of rabbit was up to  $(24.056 \pm 1.245)$  mm Hg after three weeks, which was significantly higher than that of  $(18.254 \pm 3.465)$  mm Hg in the control group, the difference was significant ( $P < 0.05$ ), after six weeks, which reached the peak, up to  $(30.214 \pm 0.766)$  mm Hg, in the eighth week, up to  $(29.144 \pm 0.685)$  mm Hg, the IOP of 16 rabbit eyes from 20 rabbit eyes in the experimental group increased. The positive rate was 80%. 2. After treatment with dexamethasone, the abnormality of nucleus of the trabecular meshwork cell increased, microfilament and microtubules among interstitial cells also increased, cytoplasmic vacuolation, rough endoplasmic reticulum expansion, as well as an increase in intercellular amorphous material.

**Conclusion:** 1. Successfully established the model which was glucocorticoid-induced high intraocular pressure on rabbit. 2. Under the transmission electron microscopy observation, a series of changes in the cytoskeleton is an important part of glucocorticoid-induced elevation of IPO. *Eye Science 2010; 25: 119-124.*

**Key words:** Glucocorticoid glaucoma; Trabecular meshwork cell; Ultrastructure

1954年 Francois 首先报道全身或局部使用糖皮质激素可引起眼内压高,发生青光眼。此后,许多学者从流行病学、形态学、生物化学、细胞生物学等不同角度,对糖皮质诱发眼内压升高的发病机制作了大量的工作,并取得某些进展,然而糖皮质激素性青光眼(GIG)的确切机制未明<sup>[1]</sup>。应用糖皮质激素可引起眼压升高,它与原发性开角型青光眼关系密切<sup>[2-6]</sup>。Tripathi 的流病资料表明,个体对糖皮质激素的易感性有一定遗传性。在正常人群中,局部给予糖皮质激素 4~6 周,40%的人出现眼压升高,其中 4%~6%的人眼压显著升高。在原发性开角型青光眼,高达 90%的患者使用糖皮质激素后眼压会进一步升高。此外,糖皮质激素反应者较非糖皮质激素反应者更易患原发性开角型青光眼。原发性开角型青光眼患者血清和房水中

可的松含量亦比正常人升高。因此,糖皮质激素诱导的高眼压模型及其小梁细胞超微结构改变的研究对了解人眼糖皮质激素性青光眼、原发性开角型青光眼的发病机制具有重要作用,也可用于寻找和筛选有效的降眼压药物。糖皮质激素对小梁细胞的作用是多方面的,它包括细胞外基质、细胞膜、细胞骨架及细胞核的多重变化。

#### 材料和方法

##### 一、材料

1. 研究对象:新西兰大白兔 40 只,(锦州医学院实验动物中心提供),裂隙灯检查眼部无疾病,雌雄各半。体重 1.5 kg 左右,兔龄 6~8 周。

2. 主要试剂和仪器:透射电镜(日本电子公司);超薄切片机(日本电子公司);裂隙灯显微镜

(重庆贝澳电子仪器有限公司);Schitoz's 眼压计(苏州仪器制造厂)0.5%地塞米松磷酸钠溶液(郑州羚锐制药有限责任公司);曲安奈德注射液(上海通用药业股份有限公司);丙美卡因(美国爱尔康公司);0.9%氯化钠注射液(中国大冢制药有限公司)。

## 二、方法

40 只新西兰大白兔,随机分为 4 组,正常对照组(10 只)、单独滴地塞米松组(10 只)、单独注射曲安奈得组(10 只)和联合用药组(10 只)。实验前连续 3 天于每日 8、10 和 12 am 用 Schitoz's 眼压计测量眼压后取平均值,最后取得兔基础眼压值。实验正式开始后,正常对照组用无菌生理盐水滴兔双眼,每日 3 次;单独滴地塞米松组用 0.5%地塞米松磷酸钠溶液滴兔双眼,每日 3 次,持续 8 周;单独注射曲安奈得组每周球结膜下注射曲安奈得 1 次(3 mg),持续 8 周;联合用药组用 0.5%地塞米松磷酸钠溶液滴兔双眼,每日 3 次,持续 8 周,每周球结膜下注射曲安奈得 1 次(3 mg)。用药开始后,第 4 天开始每 7 日用 Schitoz's 眼压计监测一日四组眼压(分别于 8、10 和 12 am 测一次眼压后取平均值),将眼内压 $\geq 21.975$  mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)并持续 1 周者纳入诱发成功模型<sup>[7]</sup>。8 周后取四组兔双眼标本,做成电镜超薄切片用于电镜研究。

## 三、统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计分析。用药前后眼内压数据的差异用自身配对 *t* 检验方法进行统计分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、眼压

采用地塞米松眼药水滴眼联合曲安奈德结膜下注射能成功获得兔糖皮质激素性高眼压模型。兔基础眼压为  $(18.082 \pm 2.398)$  mm Hg ( $n=80$ ),联合用药组兔 2~3 周眼压开始升高,第三周时升高到  $(24.065 \pm 1.245)$  mm Hg,  $P < 0.05$ ,具有统计学意义,随后眼压逐渐升高,第六周达到峰值,眼压升高到  $(30.214 \pm 0.766)$  mm Hg,第八周兔眼压为  $(29.144 \pm 0.685)$  mm Hg,  $P < 0.05$ 。联合用药组兔 20 只眼 16 只眼压升高,眼压升高率为 80%。正常对照组兔眼压无升高。其余两组兔眼压虽有所升高,但升高不

稳定,持续时间小于一周,未达到高眼压模型标准。用自身配对 *t* 检验分析发现联合用药组兔激素作用前后眼压的改变具有显著统计学意义(见表 1),联合组兔眼压随时间变化逐渐升高(见图 1)。表明用地塞米松眼药水滴眼联合曲安奈德结膜下注射可以成功诱导兔激素性高眼压。

## 二、电镜检查结果

正常兔小梁细胞排列整齐,呈长梭型,并向两极延伸,形似神经细胞伸出的轴突;细胞核规则,呈长梭型;细胞间有少量无定形物质。糖皮质激素诱导眼压升高的兔眼小梁细胞核异形性增大,细胞核边缘呈锯齿状,胞浆出现空泡变性,粗面内质网扩张,细胞膜边缘粗糙,细胞膜及细胞间质内可见微绒毛样结构,细胞间无定形物质增多(图 2)。

## 讨 论

### 一、关于激素性高眼压动物模型的建立

临床上已证实,长期局部滴用或全身应用糖皮质激素,可引起眼压升高或糖皮质激素性青光眼。由于糖皮质激素性青光眼与原发开角型青光眼的关系十分密切,两者的发病机制和病理改变也很相同。因此,糖皮质激素诱导的高眼压模型对了解人眼糖皮质激素性青光眼、原发性开角型青光眼的发病机制以及小梁细胞功能、细胞外间质生化成分的改变、房水流出阻力变化等的研究有重要的实用价值。由于糖皮质激素性高眼压模型动物在眼压升高的同时,不直接干扰破坏前房结构,避免了机械性和炎症性的影响,相对于激光光凝、前房灌注、静脉结扎等有机损伤的建模方法具有明显的优点。其不但对于研究糖皮质激素性青光眼,而且对研究开角型青光眼的发病机制也具有极重要的价值,对于研究抗青光眼药物的效果也十分理想。所以,糖皮质激素性青光眼是一种接近“天然”青光眼的理想模型。在实验动物种类的选择上,虽然家兔的房角与人房角有明显的形态学差异,但其房水外流通道却与人相同,都有连续的内皮细胞内衬,且家兔价廉、易于获得,因此家兔是最常用于建立青光眼模型的动物。有研究显示皮质类固醇诱导的持续高眼压兔眼模型有年龄依赖性,因此本实验选用 6~8 周龄幼兔作为实验对象。另外本实验结果显示兔眼表面点滴或注射皮质类固醇虽可获得眼压升高的模型,但不够稳定,尽管持续滴或注射药物,但眼压升高后

表 1 各组用药前后的眼压变化情况

时间(W)	分 组	用药前(mmHg)	用药后(mmHg)	t	P
0~1	对照组	17.446±1.887	17.958±1.730	0.572	0.598
	单滴组	18.178±3.000	17.998±2.229	0.086	0.935
	单注组	18.450±1.420	18.590±1.655	0.144	0.893
	联合组	18.254±3.465	18.028±2.207	0.133	0.901
0~2	对照组	17.446±1.887	17.722±1.620	0.310	0.772
	单滴组	18.178±3.000	18.934±1.051	0.560	0.606
	单注组	18.450±1.420	20.522±2.170	1.527	0.201
	联合组	18.254±3.465	22.116±2.000	2.372	0.077
0~3	对照组	17.446±1.887	18.006±1.450	0.438	0.684
	单滴组	18.178±3.000	19.184±0.902	0.812	0.462
	单注组	18.450±1.420	21.832±1.280	3.124	0.032
	联合组	18.254±3.465	24.056±1.245	2.921	0.043
0~4	对照组	17.446±1.887	18.286±1.762	0.574	0.597
	单滴组	18.178±3.000	22.786±1.407	4.126	0.015
	单注组	18.450±1.420	19.916±1.356	1.325	0.256
	联合组	18.254±3.465	24.348±1.279	2.994	0.040
0~5	对照组	17.446±1.887	17.992±1.056	0.436	0.685
	单滴组	18.178±3.000	20.674±1.301	2.046	0.110
	单注组	18.450±1.420	20.482±1.650	1.658	0.173
	联合组	18.254±3.465	26.404±0.995	6.150	0.004
0~6	对照组	17.446±1.887	18.302±1.255	0.743	0.499
	单滴组	18.178±3.000	20.122±1.388	2.335	0.080
	单注组	18.450±1.420	19.786±1.741	1.898	0.131
	联合组	18.254±3.465	30.214±0.766	8.059	0.001
0~7	对照组	17.446±1.887	18.856±0.704	1.607	0.183
	单滴组	18.178±3.000	22.636±1.702	2.857	0.046
	单注组	18.450±1.420	19.894±1.754	1.753	0.155
	联合组	18.254±3.465	28.982±0.702	6.108	0.004
0~8	对照组	17.446±1.887	18.160±1.545	1.160	0.310
	单滴组	18.178±3.000	21.178±1.719	2.430	0.072
	单注组	18.450±1.420	19.624±1.970	1.842	0.139
	联合组	18.254±3.465	29.144±0.685	6.999	0.002

注:对照组——生理盐水滴眼组;单注组——兔眼结膜下注射曲安奈德组;单滴组——地塞米松注射液滴眼组;联合组——地塞米松滴眼同时加注曲安奈德组

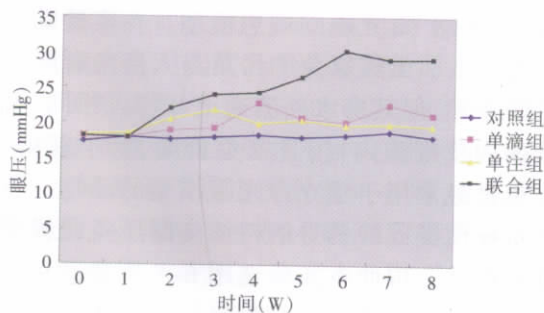


图 1 各组眼压值随时间变化情况

又返回至原来的正常水平。而采用地塞米松眼药

水滴眼的基础上,每周应用曲安奈德结膜下注射作用于6~8周龄幼兔,这样不仅使幼兔眼压升高,而且升高的眼压持续在高水平而不回降,成功诱导了兔糖皮质激素性高眼压。

### 二、糖皮质激素对小梁网的作用

人类的房水流出途径包括经小梁网的Schlemm管途径和经睫状体上腔与脉络膜上腔的葡萄膜巩膜途径,而Schlemm管途径最为重要<sup>[8]</sup>。小梁细胞的数量、结构和功能的改变是青光眼发病的细胞学基础。正常的在体小梁细胞具有活泼

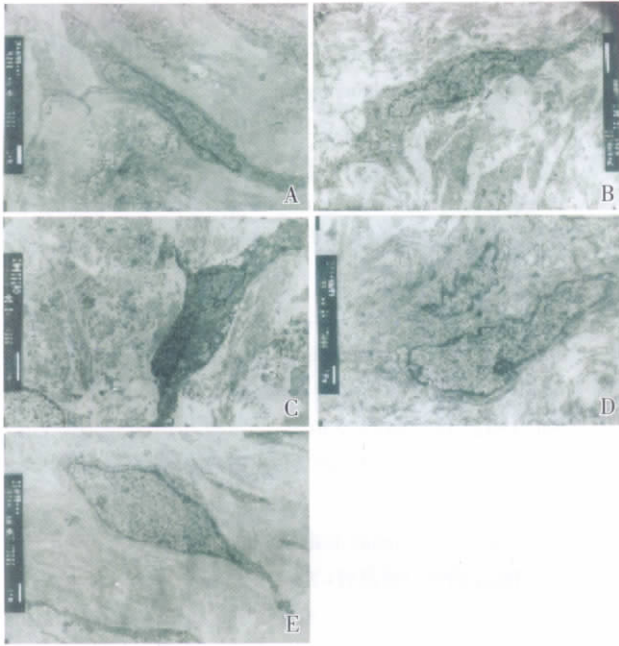


图2 正常兔小梁细胞排列整齐,细胞核规则,胞浆内细胞器结构正常(A);高眼压兔眼小梁细胞:细胞核异形性增大,细胞核边缘呈锯齿状,胞浆出现空泡变性,粗面内质网扩张(B,C);细胞膜边缘粗糙,细胞膜及细胞间质内可见微绒毛样结构,小梁细胞两极伸出的轴突样结构之间连接增多,紊乱,细胞间无定形物质增多(D,E)。

的吞噬功能,以清除小梁网上的色素、大分子物质、组织碎屑、氧化产物等,保持房水流出的通畅,而吞饮作用则是小梁细胞转运房水的主要形式;小梁细胞的功能活动与细胞表面的微绒毛、胞内框架结构和胞浆溶酶体等有关,小梁细胞功能活动的异常将导致房水流畅性的改变,引起眼内压升高<sup>[9]</sup>。对于糖皮质激素引起眼压升高的小梁网组织学改变方面,已有各种报道<sup>[8-10]</sup>,糖皮质激素对小梁细胞的作用为糖皮质激素受体所介导。研究表明,原位和体外培养的小梁细胞均含有糖皮质激素受体<sup>[11-12]</sup>。长时间使用糖皮质激素可引起小梁超微结构的改变,包括小梁细胞外物质的沉积、小梁细胞内空间的减少<sup>[12-13]</sup>。在培养的小梁细胞,糖皮质激素可引起细胞外基质的改变,如粘多糖组成发生变化,即硫酸软骨素的增加和透明质酸盐的沉积减少、糖蛋白沉积、基质蛋白合成与分解异常等<sup>[14-15]</sup>。这些改变导致小梁细胞

外基质大量增加,可能是糖皮质激素引起房水流出阻力增加主要原因之一。本研究通过电镜检查,我们观察到糖皮质激素诱导的高眼压兔眼小梁细胞膜边缘粗糙,细胞膜及细胞间质内可见微绒毛样结构,细胞核异形性增大,细胞核边缘呈锯齿状,胞浆出现空泡变性,粗面内质网扩张,小梁细胞两极伸出轴突样结构,细胞间无定形物质增多。在糖皮质激素作用下,兔眼小梁细胞胞浆出现空泡变性,粗面内质网扩张提示微丝微管的结构发生了变化,细胞核及其边缘在形态上的变化也与细胞骨架的功能改变密切相关,小梁细胞膜及细胞间质内出现的微绒毛样结构,以及细胞和细胞间无定形物质的增多,进一步提示房水外流受阻的原因,说明在糖皮质激素作用下,细胞骨架发生的一系列改变,是诱导眼压升高的重要环节。眼局部使用糖皮质激素,理论上都会通过改变细胞膜、细胞骨架、细胞核以及小梁细胞外基质,增加房水流出路径阻力,导致眼压升高,但是我们注意到,在相同条件下,并非所有局部使用糖皮质激素的兔眼均出现眼压升高,本组资料20%的兔眼局部使用糖皮质激素后眼压并没有明显升高,说明兔对糖皮质激素的反应存在一定异质性。

#### 参考文献

1. Yamamoto Y, Komatsu T, Koura Y, et al. Intraocular pressure elevation after intravitreal or posterior sub-Tenon triamcinolone acetonide injection [J]. *Can J Ophthalmol*, 2008, 43(1): 42-47.
2. Gerzenstein SM, Pletcher MT, Cervino AC, et al. Glucocorticoid receptor polymorphisms and intraocular pressure response to intravitreal triamcinolone acetonide [J]. *Ophthalmic Genet*, 2008, 29(4): 166-170.
3. Jia LY, Sun L, Fan DS, et al. Effect of topical Ginkgo biloba extract on steroid-induced changes in the trabecular meshwork and intraocular pressure [J]. *Arch Ophthalmol*, 2008, 126(12): 1700-1706.
4. Tripathi RC, Parapuram SK, Tripathi BJ, et al. Corticosteroids and Glaucoma risk [J]. *Drugs Aging*, 1999, 15: 439-450.

5. Stokes J, Walker BR, Campbell JC, et al. Altered Peripheral sensitivity to glucocorticoid in primary open-angle glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(12):5163-5167.
6. 徐岩, 陈祖基, 宋洁贞. 复方卡波姆诱发的兔高眼压模型与其它兔高眼压模型比较研究[J]. *中华眼科杂志*, 2002, 38(3):172-175.
7. Otte C, Wüst S, Zhao S, et al. Glucocorticoid receptor gene and depression in patients with coronary heart disease: the Heart and Soul Study-2009 Curt Richter Award Winner [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2009, 34(10):1574-1581.
8. Nehmé A, Lobenhofer EK, Stamer WD, et al. Glucocorticoids with different chemical structures but similar glucocorticoid receptor potency regulate subsets of common and unique genes in human trabecular meshwork cells [J]. *BMC Med Genomics*, 2009, 2:58.
9. Zhang X, Ognibene CM, Clark AF, Yorio T. Dexamethasone inhibition of trabecular meshwork cell phagocytosis and its modulation by glucocorticoid receptor beta [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84(2):275-284.
10. Hermende MR, Eenk EJ, Weinstein B. Glucocorticoid target cells in Human outflow pathway [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983, 24:1612-1616.
11. Potau JM, Canals M, Costa J, et al. Ultrastructural characteristics of glaucomatous trabecular meshwork [J]. *Arch Soc Esp Ophthalmol*, 2000, 75(1):21-28.
12. Johnson D, Gottanka J, Flügel C, et al. Ultrastructural changes in the trabecular meshwork of human eyes treated with corticosteroids [J]. *Arch Ophthalmol*, 1997, 115(3):375-383.
13. Steely HT, Browder SL, Julian MB, et al. The effects of Dexamethasone on fibronectin expression in cultured human trabecular Meshwork cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, 33:2242-2250.
14. Diekerson JE, Steely HT, English-Wright SL, et al. The effects of dexamethasone on integrin and laminin expression in cultured human trabecular meshwork cells [J]. *Exp Eye Res*, 1998, 66:731-738.
15. Zhuo YH, Huang YL, Wei YT, et al. Glucocorticoids upregulate transepithelial electrical resistance and expression of tight junction-related protein in human trabecular meshwork cells [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118(20):1742-1745.

(收稿日期:2010-09-05;编辑:杨江瑜)

(上接第 118 页)

22. Abdouh M, Bernier G. In vivo reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(1):153-164.
23. Sakai T, Kuno N, Takamatsu F, et al. Prolonged protective effect of basic fibroblast growth factor-impregnated nanoparticles in royal college of surgeons rats [J]. *IOVS*, 2007, 48(1):3381-3387.
24. O'Driscoll C, O'Connor J, O'Brien CJ, et al. Basic fibroblast growth factor-induced protection from light damage in the mouse retina in vivo [J]. *J Neurochem*, 2008, 105(2):524-536.

(Receiving date: 2010-09-05; Editor: Jianhua Liu)