

多西环素对碱烧伤大鼠角膜炎症细胞浸润的抑制作用

赵静博, 邹文进, 付馨余

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81160119); 广西自然科学基金(No. 2012GXNSFAA053107); 广西高等学校立项科研项目(No. 201204LX064)

作者单位: (530021) 中国广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院眼科

作者简介: 赵静博, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼表疾病。

通讯作者: 邹文进, 博士, 副教授, 研究方向: 眼表疾病、角膜病、眼外伤。bigstone168@163.com

收稿日期: 2013-01-29 修回日期: 2013-05-27

Doxycycline inhibits the infiltration of inflammatory cells in rat alkali burn corneas

Jing-Bo Zhao, Wen-Jin Zou, Xin-Yu Fu

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 801160119); Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China (No. 2012GXNSFAA053107); Foundation for University Teacher of Guangxi (No. 201204LX064)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Wen-Jin Zou. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. bigstone168@163.com

Received: 2013-01-29 Accepted: 2013-05-27

Abstract

• **AIM:** To investigate the inhibited effect of Doxycycline on the infiltration of inflammatory cells in rat alkali burn corneas.

• **METHODS:** Corneas of 32 SD rats were injured with 1mol/L NaOH, then divided into two groups: control and doxycycline-treated. All agents were administered topically 4 times daily. Slit-lamp microscope was performed and inflammatory index was calculated at 3, 7, 14 and 21 days after injury. Then 4 rats were randomly sacrificed and each cornea was divided into two parts, one for histopathology, the other for ICAM-1 ELISA assay.

• **RESULTS:** In control group, the inflammatory index and the number of inflammatory cell was higher than the doxycycline-treated dramatically at all time points ($P < 0.05$). Compared with control group, corneal ICAM-1 expression decreased significantly in doxycycline-treated group at all time points ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Doxycycline may inhibit inflammatory cell infiltration by down-regulating ICAM-1 expression.

• **KEYWORDS:** Doxycycline; alkali burn; cornea; inflammatory cells

Citation: Zhao JB, Zou WJ, Fu XY. Doxycycline inhibits the infiltration of inflammatory cells in rat alkali burn corneas. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(6):1090-1092

摘要

目的: 观察多西环素对碱烧伤大鼠角膜炎症细胞浸润的抑制作用。

方法: 健康SD大鼠32只,随机分为对照组、多西环素组,每组16只大鼠。建立角膜碱烧伤模型后,多西环素组予3g/L多西环素眼液点眼,对照组予眼液溶媒点眼。分别于碱烧伤后第3,7,14,21d观察计算炎症指数,角膜取材后进行病理切片及炎症细胞计数,行ICAM-1的ELISA检测。

结果: 多西环素组各时间点结膜充血、角膜水肿较对照组轻,炎症指数均明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。多西环素组各时间点炎症细胞计数少于对照组($P < 0.05$)。多西环素组各时间点大鼠角膜的ICAM-1表达低于对照组($P < 0.05$)。

结论: 多西环素可以抑制碱烧伤大鼠角膜的炎症细胞浸润,其机制可能是抑制ICAM-1的表达。

关键词: 多西环素; 碱烧伤; 角膜; 炎症细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.07

引用: 赵静博, 邹文进, 付馨余. 多西环素对碱烧伤大鼠角膜炎症细胞浸润的抑制作用. 国际眼科杂志 2013;13(6):1090-1092

0 引言

角膜碱烧伤是严重的致盲性眼外伤,烧伤早期即有大量炎症细胞浸润,炎症细胞分泌炎症因子趋化更多的炎症细胞,放大炎症反应;同时分泌基质金属蛋白酶,溶解角膜基质,导致角膜溃疡、穿孔^[1]。因此,炎症细胞在角膜碱烧伤的病理过程中起主导地位。抑制炎症细胞浸润可以促进角膜上皮愈合,减少角膜溃疡发生^[2-4],抑制新生血管形成^[5,6]。多西环素具有强大的抗炎作用,应用于人腹主动脉瘤的研究发现,多西环素可以使腹主动脉瘤管壁中的中性粒细胞减少72%,使细胞毒性T细胞的数量减少95%,并且可以抑制多种炎症因子的表达^[7]。我们通过大鼠角膜碱烧伤模型观察多西环素对炎症细胞浸润的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD(sprague dawley)大鼠32只,雌性,体质量180~220g,购自广西医科大学动物实验中心提供,实验前裂隙灯检查排除眼部疾病。实验动物随机分为对照组、多西环素组,每组16只大鼠。多西环素组予3g/L多西环素眼液点眼,对照组予眼液溶媒点眼。眼液溶媒除不含多西环素外,其余成分与3g/L多西环素眼液相同。多西环素购自Sigma公司,使用前配制成眼液。ELISA试剂盒购自RapidBio Lab公司。

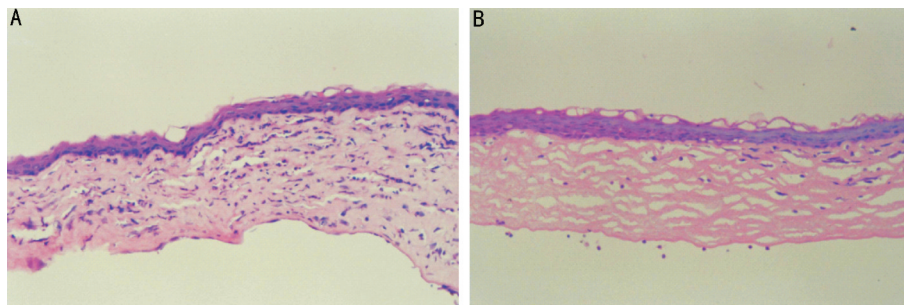


图1 大鼠角膜碱烧伤后3d角膜炎症细胞变化(HE×200) A:对照组;B:多西环素组。

1.2 方法 碱烧伤模型制备前1d予5g/L妥布霉素眼液每天4次和10g/L阿托品眼液点眼1次。按照0.2mL/100g体质量腹腔注射氯胺酮和氯丙嗪1:1混合液,结膜囊内滴10g/L丁卡因表面麻醉,棉签擦干结膜囊内液体。使用自制碱烧伤模具制作大鼠角膜碱烧伤模型。碱烧伤模具的制备过程如下:在200 μ L容积的枪头距尾部15mm处水平切去枪头前端,用刀片小心将切口端外部削薄。在枪头内填塞适量棉花,枪头切口端外露棉花形成平整的微凸面,松紧度适中,模具尾部用纸胶布封贴,模具容积为220 μ L,高温高压消毒灭菌备用。于大鼠角膜碱烧伤模具内滴入220 μ L浓度为1mol/L NaOH后,将模具垂直放置于大鼠角膜中央30s,迅速用30mL生理盐水冲洗结膜囊。冲洗完毕每只大鼠角膜中央均可见一个圆形灰白色烧灼斑,直径约4mm。每组大鼠于角膜碱烧伤后立即予眼液点眼,每日4次,分别于碱烧伤后3,7,14,21d随机选取4只大鼠,腹腔注射氯胺酮和氯丙嗪1:1混合液诱导麻醉,裂隙灯下观察,评估炎症指数。随即处死大鼠,角膜取材,均分两半,一半10%福尔马林固定,做病理组织切片,HE染色;另一半-80 $^{\circ}$ C保存,备ELISA检测用。实验动物发生严重眼内出血、角膜溶解穿孔或感染则予剔除。

1.2.1 炎症指数的计算 碱烧伤后第3,7,14及21d,裂隙灯下观察大鼠角膜缘血管环充血情况、周边角膜和中央角膜水肿程度、角膜上皮愈合情况等,计算炎症指数。炎症指数按以下标准评分^[8]:(1)结膜充血:0分:无充血;1分:角膜缘血管环轻度充血;2分:角膜缘血管环中度充血;3分:角膜缘血管环重度充血,血管怒张。(2)中央角膜水肿:0分:透明,无水肿;1分:中央角膜水肿,可看到虹膜纹理;2分:中央角膜水肿,但看不清虹膜纹理;3分:中央角膜水肿,看不清瞳孔;(3)外周角膜水肿:0分:透明,无水肿;1分:外周角膜水肿,可看到虹膜纹理;2分:外周角膜水肿,但看不清虹膜纹理;3分:中央角膜水肿,看不清虹膜。炎症指数即为上述三项得分相加除以9。

1.2.2 炎症细胞的计数 4%福尔马林固定的大鼠角膜,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。按角膜的最大径线切片,厚度5 μ m,脱蜡、复水,常规HE染色,中性树脂封片,光镜下观察。于400倍镜下(BX50, Olympus)计数炎症细胞数,计数范围由目镜测微尺划定。目镜测微尺共有100个小方格,分别计数切片中角膜周边部、中周部及角膜中央共5个视野中方格内的炎症细胞数,取平均值,按均数 \pm 标准差表示。炎症细胞包括中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞。胞核深染,杆状或分叶状,胞浆猩红色者为中性粒细胞。胞核深染,圆形或椭圆形,胞浆极少者为淋巴细胞。胞核深染,呈马蹄形或不规则,胞体较大者为巨噬细胞。

表1 各组大鼠各时间点角膜碱烧伤炎症指数

分组	3d	7d	14d	21d	$\bar{x}\pm s$
对照组	0.67 \pm 0.00	0.87 \pm 0.32	0.61 \pm 0.36	0.67 \pm 0.52	
多西环素组	0.45 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.14 ^a	0.04 \pm 0.06 ^a	0.19 \pm 0.11	

^a P <0.05 vs 对照组。

1.2.3 ELISA检测各组大鼠角膜ICAM-1蛋白变化

ICAM-1蛋白含量用酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunoassay, ELISA)试剂盒(RapidBio Lab, USA)检测。每一时间点实验组与对照组各取6个角膜标本,剪碎,加入200 μ L纯水电动匀浆,冷冻离心机(UNIVERSAL 32R, Hettich Zentrifugen)15000r/min 4 $^{\circ}$ C离心20min,取上清备用。BCA法测各标本总蛋白浓度(mg/mL)。ELISA检测按照试剂盒说明书操作,酶标仪(Multiskan MK 3, Thermo Labsystem)测量570nm吸光度值,通过标准曲线得到ICAM-1蛋白浓度(ng/mL)。ICAM-1蛋白浓度比上总蛋白浓度即为单位总蛋白中的ICAM-1蛋白浓度(μ g/g总蛋白)。

统计学分析:两组各时间点的炎症指数、炎症细胞计数及ICAM-1表达浓度均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用SPSS 13.0统计软件进行统计处理,进行独立样本 t 检验, P <0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠角膜炎症指数变化 碱烧伤后第3,7d,对照组结膜充血与角膜水肿明显,多西环素组较对照组轻。第14,21d起,对照组结膜充血及角膜水肿减轻,多西环素组较对照组轻,而且角膜透明度高,瘢痕轻。两组大鼠角膜碱烧伤后各时间点炎症指数见表1。多西环素组各时间点炎症指数均明显低于对照组,除第21d略有回升外,其余各时间点与对照组比较均有统计学差异(P >0.05)。

2.2 各组大鼠角膜炎症细胞变化 第3d:对照组,角膜上皮水肿,3~4层细胞,局部区域有气球样变,部分上皮与实质层分离,形成上皮大泡;实质层水肿明显,纤维排列紊乱,大量炎症细胞浸润(图1A);多西环素组,角膜上皮水肿,细胞4~5层,较多区域气球样变;实质层水肿明显,纤维排列不规则,少量炎症细胞浸润(图1B)。第7d:对照组,角膜上皮水肿,细胞4~5层;实质层水肿明显,纤维排列紊乱,大量炎症细胞浸润,角膜中周部大量新生血管长入;多西环素组,角膜上皮水肿,细胞4~5层,局部气球样变;实质层轻度水肿,纤维排列不规则,少量炎症细胞浸润,周边角膜有新生血管长入。第14,28d:对照组,角膜上皮细胞4~6层;实质层轻度水肿,纤维排列紊乱,较多炎症细胞浸润,新生血管进入角膜中央;多西环素组,角膜上皮2~4层;实质层无水肿,纤维排列尚规则,少许炎症

细胞浸润。两组大鼠角膜碱烧伤各时间点炎症细胞计数见表2。

2.3 各组大鼠角膜 ICAM-1 蛋白变化 大鼠角膜碱烧伤后各时间点角膜 ICAM-1 表达情况见表3。对照组第3d ICAM-1 的表达最高,随时间推移表达逐渐降低。多西环素组第3d低表达,第7d表达升高,第14,21d逐渐下降,除第7d时 $P=0.072$ 外,其余各时间点与对照组比较均有统计学差异 ($P<0.05$)。

3 讨论

炎症是角膜碱烧伤的基本病理生理过程,也是影响角膜碱烧伤预后的一个重要因素。角膜碱烧伤后12~24h即有大量的炎症细胞浸润,主要是中性粒细胞和单核巨噬细胞。这些炎症细胞由血管渗漏而来,趋化至损伤区域,释放炎症因子如 MMP, IL-1, TNF, IFN- γ 及趋化因子 MIP, MCP 和 IL-8 等,一方面引起局部炎症反应,另一方面募集更多的炎症细胞进入角膜,此即为第二波的炎症细胞浸润。第二波的炎症细胞浸润始于烧伤后第7d,第14~21d达高峰,其分泌炎症因子的高峰与组织胶原酶激活时间重叠,容易发生角膜溃疡及穿孔。第二波的炎症细胞浸润主要由第一波的炎症细胞分泌的炎症因子趋化。因此,控制炎症的关键在于控制炎症细胞浸润,特别是第一波次的炎症细胞浸润^[1]。

多西环素具有多方面的抗炎机制,可选择性地使入腹主动脉瘤管壁的中性粒细胞减少72%,使细胞毒性T细胞的数量减少95%;显著地抑制基质金属蛋白酶 MMP8 和 MMP9 的 mRNA 表达;通过转录激活蛋白-1 (AP-1) 途径抑制 IL-6, IL-8 的表达;通过核转录因子 C/EBP 途径抑制 IL-8, 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 的表达^[7];还可以抑制 IL-1 β , TNF- α , IL-6 和 IFN- γ 等多种炎症因子的产生^[9,10]。本实验对照组第3d角膜大量炎症细胞浸润,并于第7d达到高峰,然后逐渐减轻,但仍维持在较高的水平,炎症的变化规律与以前的报导一致。炎症指数亦于第3d明显升高,第7d达到高峰,其动态变化与炎症细胞浸润的规律一致。多西环素组各个时间点的炎症指数及炎症细胞数均低于对照组,差异具有统计学意义。表明3g/L多西环素眼液具有抑制碱烧伤大鼠角膜炎症细胞浸润的作用。

炎症细胞与角膜基质的黏附主要由 ICAM-1 介导^[11]。肖启国等^[12]研究表明,多西环素可以抑制结膜上皮细胞表达 ICAM-1。我们使用 ELISA 方法检测大鼠角膜 ICAM-1 的表达显示,对照组大鼠角膜第3d出现 ICAM-1 高表达,然后逐渐降低,但维持在较高水平,多西环素组各时间点 ICAM-1 表达均明显低于对照组,除第7d时 $P=0.072$ 外,其余各时间点 ICAM-1 表达与对照组相比均有统计学差异。实验数据说明,多西环素可以抑制碱烧伤大鼠角膜表达 ICAM-1。碱烧伤角膜表达 ICAM-1 的变化规律与角膜炎症细胞计数变化规律一致,说明了 ICAM-1 可能在介导角膜炎症细胞浸润过程中起重要作用。

表2 各组大鼠角膜碱烧伤后各时间点炎症细胞计数

分组	($\bar{x}\pm s$, 个/高倍视野)			
	3d	7d	14d	21d
对照组	36.2 \pm 22.5	55.0 \pm 46.2	23.2 \pm 12.3	27.2 \pm 20.3
多西环素组	11.3 \pm 2.4 ^a	2.5 \pm 1.4 ^a	8.2 \pm 3.3 ^a	0.8 \pm 0.7 ^a

^a $P<0.05$ vs 对照组。

表3 两组大鼠角膜各时间点的 ICAM-1 表达 ($\bar{x}\pm s$, μ g/g 总蛋白)

分组	($\bar{x}\pm s$, μ g/g 总蛋白)			
	3d	7d	14d	21d
对照组	150.9 \pm 57.7	123.9 \pm 61.1	110.4 \pm 35.2	90.5 \pm 34.6
多西环素组	37.4 \pm 10.6 ^a	66.9 \pm 17.1	59.1 \pm 11.5 ^a	46.2 \pm 10.5 ^a

^a $P<0.05$ vs 对照组。

综上所述,多西环素可以减轻碱烧伤大鼠角膜的炎症反应,减少炎症细胞浸润。多西环素作用下,碱烧伤大鼠角膜表达 ICAM-1 降低,可能是多西环素抑制角膜炎症细胞浸润的机制。这一研究结果可能为角膜碱烧伤的治疗开辟新的思路。

参考文献

- 1 Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Survey of Ophthalmology* 1997;41(4):275-313
- 2 Wagoner MD, Kenyon KR, Gipson IK, et al. Polymorphonuclear neutrophils delay corneal epithelial wound healing *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25(10):1217-1220
- 3 Foster CS, Zelt RP, Mai-Phan T, et al. Immunosuppression and selective inflammatory cell depletion. Studies on a Guinea pig model of corneal ulceration after ocular alkali burning. *Arch Ophthalmol* 1982;100(11):1820-1824
- 4 Kenyon KR, Berman M, Rose J, et al. Prevention of stromal ulceration in the alkali-burned rabbit cornea by glued-on contact lens. Evidence for the role of polymorphonuclear leukocytes in collagen degradation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18(6):570-587
- 5 Riazi-Esfahani M, Peyman GA, Aydin E, et al. Prevention of Corneal Neovascularization: Evaluation of Various Commercially Available Compounds in an Experimental Rat Model. *Cornea* 2006;25(7):801-805
- 6 Dan L, Shi-long Y, Miao-li L, et al. Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Curr Eye Res* 2008;33(8):653-660
- 7 Lindeman JH, Abdul-Hussien H, van Bockel JH, et al. Clinical Trial of Doxycycline for Matrix Metalloproteinase-9 Inhibition in Patients With an Abdominal Aneurysm: Doxycycline Selectively Depletes Aortic Wall Neutrophils and Cytotoxic T Cells. *Circulation* 2009;119:2209-2216
- 8 Laria C, Alió JL, Ruiz-Moreno JM. Combined non-steroidal therapy in experimental corneal injury. *Ophthalmic Res* 1997;29:145-153
- 9 Solomon A, Rosenblatt M, Li D, et al. Doxycycline inhibition of interleukin-1 in the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2544-2557
- 10 Krakauer T, Buckley M. Doxycycline is anti-inflammatory and inhibits Staphylococcal exotoxin-induced cytokines and chemokines. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(11):3630-3633
- 11 Gan L, Fagerholm P. Leukocytes in the Early Events of Corneal Neovascularization. *Cornea* 2001;20(1):96-99
- 12 肖启国,刘祖国,张梅,等. 多西环素对培养的人结膜上皮细胞炎症反应及凋亡的影响. *中华眼科杂志* 2005;41(9):842-846