

# 豚鼠眶周注射曲安奈德/透明质酸酶后的病理变化

成磊<sup>1</sup>, 王琼<sup>1</sup>, 雷松<sup>2</sup>, 何为民<sup>1△</sup>

1. 四川大学华西医院 眼科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 病理科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 评价豚鼠眶周注射曲安奈德/透明质酸酶后病理形态学的改变。方法 将 20 只清洁级荷兰种豚鼠随机分成 A、B、C、D 4 个实验组, 每组 5 只, 每只豚鼠右眼作为实验眼, 左眼作为空白对照。A 组实验眼眶周注射生理盐水 0.2 mL, B 组注射曲安奈德 2 mg(0.2 mL), C 组注射透明质酸酶 80 IU(0.2 mL), D 组注射曲安奈德 2 mg(0.1 mL)+透明质酸酶 80 IU(0.1 mL), 每周注射 1 次, 连续注射 4 次。4 组均以第 1 次注射为时间原点, 在之后的第 3 d、7 d、14 d、28 d、35 d 分次各取 1 只豚鼠处死, 取眶周组织标本常规石蜡包埋切片, 经苏木精-伊红(HE)染色及 Masson 三色染色后进行形态学观察, 期间取各组少量第 3 次标本组织进行电镜观察, 并筛选部分肉芽肿形成良好的标本进行转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 免疫组织化学染色观察。结果 与空白对照组相比, A 组眶周组织 HE 染色无明显病理改变, C 组眶周结缔组织较空白对照组疏松, 细胞间隙增宽。B 组第 2 到 5 次切片中均可见异物肉芽肿组织, D 组在第 3 次和第 5 次切片中也观察到散在的肉芽肿样组织, 但从 HE 及 Masson 三色染色切片的对比发现, D 组肉芽肿的大小及其中类上皮细胞和成纤维细胞密度均较 B 组低。B 组肉芽肿区域 TGF- $\beta_1$  染色呈强阳性, D 组肉芽肿区域 TGF- $\beta_1$  染色呈弱阳性, D 组染色阳性细胞数量少于 B 组, 两组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。电镜观察发现 B 组成纤维细胞多为高活跃状态, 细胞呈矮胖形, 核卵圆状, 胞浆多, 细胞器发达, C 组、D 组成纤维细胞处于相对低活跃状态, 细胞及核均呈长梭状, 胞浆少, 细胞器不发达。结论 长期反复眶周注射曲安奈德可导致注射区域异物肉芽肿的形成, 进行性纤维化, 并与周围组织产生粘连。联合透明质酸酶注射能增强曲安奈德的有效扩散和吸收, 减轻因药物吸收不良所引起的晚期并发症。

**【关键词】** 眶周注射 曲安奈德 透明质酸酶 并发症 病理学

**Pathological Changes after Periocular Injection of Triamcinolone and Hyaluronidase in Guinea Pigs** CHENG Lei<sup>1</sup>, WANG Qiong<sup>1</sup>, LEI Song<sup>2</sup>, HE Wei-min<sup>1△</sup>. 1. Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: hewm888@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To analyze the pathological change after periocular injection of triamcinolone and hyaluronidase in guinea pigs. **Methods** Twenty guinea pigs of clean grade were used in this study. The animals were randomly divided into 4 groups ( $n=5$  each). The right eye was used as intervention side, while the left eye was used as control side. Group A received periocular injection of saline water 0.2 mL at right eyes, Group B received periocular injection of triamcinolone 2 mg (0.2 mL), Group C received periocular injection of hyaluronidase 80 IU (0.2 mL), Group D received periocular injection of triamcinolone 2 mg (0.1 mL)+hyaluronidase 80 IU (0.1 mL). The injection was performed once a week for totally 4 times. One animal from each group was sacrificed at day 3, 7, 14, 28 and 35 after the first injection. The specimens of periocular tissue were obtained for microscopic examination and transmission electron microscopic examination to observe the pathological changes. The expressions of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) in the granulomas were detected by immunohistochemistry stain method. **Results** Compared with the control side, group A presented no obvious change. Group C presented looser intercellular space than the control group. Foreign-body granulomas was seen in 2<sup>nd</sup>-5<sup>th</sup> pathological section of group B and in the third and fifth pathological sections of group D. The size of the granulomas was smaller and the density of fibroblast was lower in group D than those in group B. The immunohistochemistry stain of TGF- $\beta_1$  showed strong positive reaction in group B, while weakly positive reaction in group D. The positive staining cells in group D were fewer than those in group B, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Most of the fibroblasts in group B presented as pyknic type with oval nucleus, amounts of cytoplasm and cell organs under electron microscope. Comparatively, the fibroblasts in group C and D remain inactive with spindle nucleus, less cytoplasm

and cell organs. **Conclusion** Repeated periocular injection of triamcinolone may cause the formation of foreign-body granulomas around the injection site, leading to fibrosis and adhesion at later period. The injection combined with hyaluronidase can enhance the diffusion and absorption of triamcinolone, relieving the possible fibrosis.

**【Key words】** Periocular injection Triamcinolone Hyaluronidase Complication Pathology

近年来眶周或病变内注射曲安奈德越来越广泛地应用于眼科临床,治疗如甲状腺相关眼病、眼眶炎性假瘤、球后视神经炎、黄斑囊样水肿、婴儿型血管瘤和黄色肉芽肿等疾病,由于可以避免系统应用糖皮质激素和细胞毒制剂及其他免疫抑制剂引起的全身毒副作用,局部注射曲安奈德已被证实为一种安全、简便、有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。但是对局部注射曲安奈德的给药剂量、给药次数、远期疗效以及副作用尚缺乏系统的总结和研究,尤其是临床上部分疾病需要重复注射,对于多次注射后可能导致的眼眶组织病理改变亦未见相关报道。透明质酸酶是一种能特异性分解透明质酸的蛋白水解酶,该酶可水解细胞外基质中的主要成分透明质酸,增加组织的通透性,促使皮下输液和局部积贮的渗出液或血液的吸收,已被广泛应用于临床,在眼科临床应用研究中已被用作局部麻醉及白内障、青光眼、玻璃体视网膜手术治疗中的辅助用药<sup>[2]</sup>。本实验拟评价豚鼠眶周注射曲安奈德/透明质酸酶后的病理形态学改变,为眶周多次重复注射曲安奈德可能引起的远期并发症以及联合透明质酸酶注射以减轻和避免此种并发症的发生提供组织学证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

6周龄清洁级荷兰种豚鼠20只(四川大学实验动物中心提供),体质量约250~300g,随机分成A、B、C、D4个组,每组5只,每只豚鼠均选择右眼作为实验眼,左眼作为空白对照。

### 1.2 实验分组

10%水合氯醛水溶液腹腔注射麻醉豚鼠后,A组实验眼眶周注射生理盐水0.2mL,B组注射曲安奈德(Lisapharma S. P. A.,意大利)2mg(0.2mL),C组注射透明质酸酶(Sigma公司,美国)80IU(0.2mL),D组注射曲安奈德2mg(0.1mL)+透明质酸酶80IU(0.1mL),以后每周注射1次,连续注射4次。注射时在豚鼠下方眶缘由后向前的狭窄处垂直进针,刺入眶内2~3mm后将药液缓慢注入,每次注射部位相同。4组分别于第1次注射后的第3d、7d、14d、28d、35d各取1只豚鼠处死,获

取眶周组织标本。

### 1.3 病理检查

**1.3.1 常规病理检查** 10%福尔马林固定标本,24h后石蜡包埋、用超薄切片机切片、HE及Masson三色染色。在光学显微镜下观察组织学改变。

**1.3.2 免疫组织化学染色** 常规方法制作组织切片,采用卵白素-生物素-过氧化物酶复合物法(ABC法)对切片进行转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )染色,光镜下观察。一抗为兔抗人TGF- $\beta_1$ 多克隆抗体(Abcam公司,英国),工作浓度3 $\mu$ g/mL。每次均以已知免疫组化染色阳性切片作阳性对照,以PBS缓冲液代替一抗作阴性对照。结果判断:在细胞膜和(或)细胞质内出现较强、棕黄色或棕红色、颗粒状的染色时定为细胞因子染色阳性,根据细胞染色程度和着色细胞数量确定染色程度:①弱阳性:细胞着色为淡棕色,着色细胞散在分布;②阳性:细胞着色为棕色,着色细胞量多;③强阳性:细胞着色为深棕色,着色细胞量多而密集。选取同一时间点(第5次)B组和D组TGF- $\beta_1$ 染色切片,计数5个高倍(400倍)视野中染色呈阳性的细胞数目,记录结果。

**1.3.3 电镜制备及观察** 取B、D组同一时间点(第3次)眶周标本各1mm<sup>3</sup>,经3%戊二醛、1%锇酸固定,梯度脱水、812树脂包埋,超薄切片,醋酸钠及枸橼酸铅双染色,透射电镜(Hitachi公司,日本)观察成纤维细胞的超微结构。

### 1.4 统计学方法

采用两独立样本Mann-Whitney秩合检验进行免疫组化染色结果的组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HE及Masson染色观察情况

与空白对照组(图1A)相比,A组(图1B)眶周组织HE染色切片无明显病理改变,而C组(图1C)眶周结缔组织较空白对照组疏松,细胞间隙增宽。

B组(图2)第2~5次切片中均可见异物肉芽肿组织,HE及Masson染色切片中显示肉芽肿中央为吸收不良的药液,早期表现为均质淡染区,药液周边主要由上皮样细胞组成,细胞胞体较大,胞浆丰

富,染成浅粉色,核圆形、卵圆形、梭形、黄瓜形等多种形态,可有 1~2 个核仁。肉芽肿组织中还可可见新生毛细血管及散在的多核巨噬细胞,上皮样细胞外围被增生的纤维结缔组织包绕。另外,从 B 组第 2、3、5 次 3 个时间点切片的观察比较,可以发现肉芽肿内上皮样细胞及成纤维细胞的数量逐次增加,密

度逐次增高,同时越来越靠近肉芽肿的中心。

与 B 组相比,D 组在第 3、5 次切片中也观察到散在的肉芽肿样组织,但从 Masson 染色切片(图 3)的对比发现,D 组中肉芽肿的大小较 B 组小,其上皮样和成纤维细胞的密度均较 B 组低,中央增生的胶原纤维数量较 B 组少。

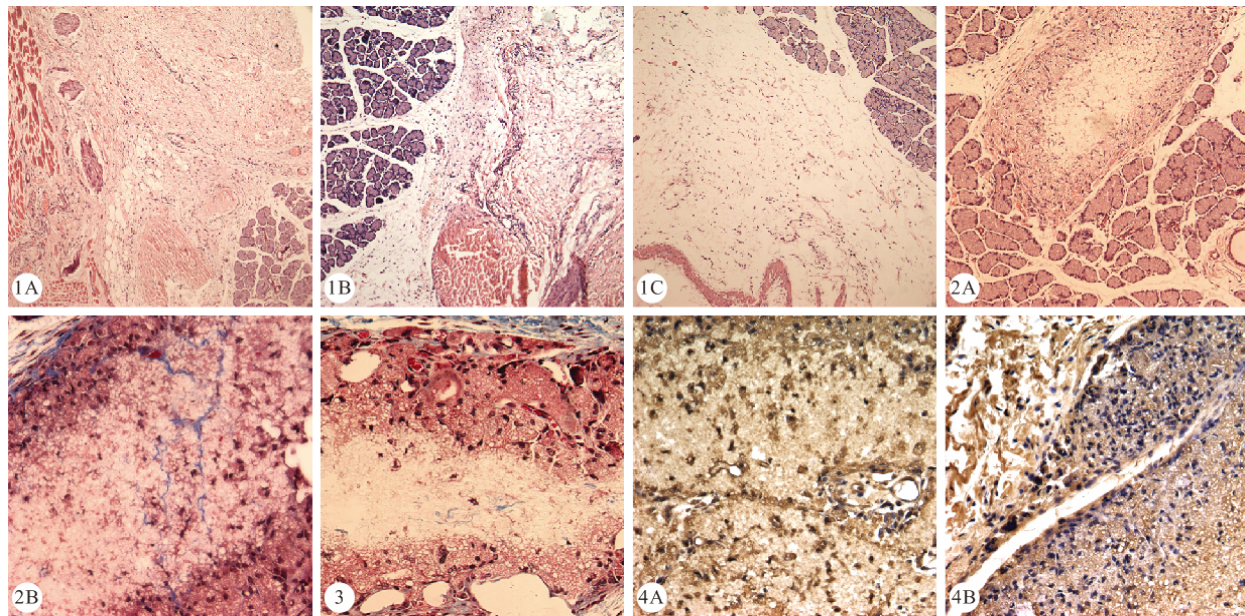


图 1 空白对照组(A)、A 组(B)、C 组(C)眶周组织。HE  $\times 100$

图 2 B 组第 5 次眶周组织。(A:HE  $\times 200$ ;B:Masson  $\times 400$ )

图 3 D 组第 5 次眶周组织。Masson  $\times 400$

图 4 B 组(A)及 D 组(B)肉芽肿区域 TGF- $\beta_1$  染色。ABC  $\times 400$

Fig 1 Periocular tissue of control group (A), Group A (B) and Group C (C). HE  $\times 100$

Fig 2 Periocular tissue of Group B after 5<sup>th</sup> injection (A:HE  $\times 200$ ; B:Masson  $\times 400$ )

Fig 3 Periocular tissue of Group D after 5<sup>th</sup> injection. Masson  $\times 400$

Fig 4 TGF- $\beta_1$  in the granulomas of Group B (A) and Group D (B). ABC  $\times 400$

## 2.2 免疫组织化学染色结果

B 组肉芽肿区域 TGF- $\beta_1$  染色呈强阳性,着色细胞数量多而密集,染色呈深棕色(图 4A)。D 组肉芽肿区域 TGF- $\beta_1$  染色呈弱阳性,着色细胞数量少,呈散在分布,染色呈浅棕黄色(图 4B)。B 组 5 个高倍视野中染色阳性的细胞数目为:148,116,128,157,81;D 组染色阳性的细胞数目为:25,52,56,81,53。两组之间差异有统计学意义( $Z = -2.514, P = 0.012$ )。

## 2.3 电镜观察结果

B 组成纤维细胞多为高活跃状态,细胞呈矮胖形,核卵圆状,胞浆多,细胞器发达,可见增生扩张的粗面内质网、线粒体,胶原纤维量多、致密、排列紊乱(图 5A)。D 组成纤维细胞处于相对低活跃状态,细胞及核均呈长梭状,胞浆少,细胞器不发达(图 5B)。

## 3 讨论

曲安奈德是一种非水溶性、人工合成的含氟长

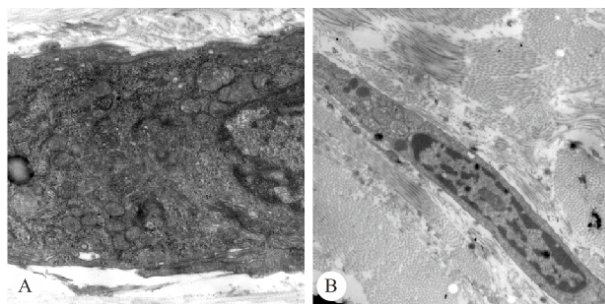


图 5 B 组(A, $\times 3000$ )及 D 组(B, $\times 2000$ )电镜下成纤维细胞的改变

Fig 5 Fibroblasts change of Group B (A,  $\times 3000$ ) and Group D (B,  $\times 2000$ ) under electron microscope

效糖皮质激素,该药为白色或类白色结晶状粉末,难溶于水。其难溶于水的特性使其在局部用药时吸收缓慢,作用可持续 2~3 周甚至更长时间,其效力是强的松的 20~30 倍。它作用于眼组织的重要效果是减轻免疫反应、降低炎症区血管的通透性、抑制炎症细胞的趋化运动以及吞噬细胞的功能,并阻止补

体参与炎症反应<sup>[3]</sup>。它可以耗竭淋巴细胞,尤其对T淋巴细胞作用明显,还可以降低自身免疫性抗体的水平。眼眶组织内存在着的激活淋巴细胞是糖皮质激素治疗的基本要求<sup>[4]</sup>。本实验通过在豚鼠眶周注射曲安奈德发现注射7d后注射区域可见异物肉芽肿反应,多次注射后肉芽肿内上皮样细胞和成纤维细胞的数量逐渐增多,并向肉芽肿中心靠近,提示长期反复的眶周注射曲安奈德可致注射部位异物肉芽肿形成,眶周组织进行性纤维化,最终与周围组织产生粘连。

作为细胞外基质的一种主要物质,具有高黏弹性的透明质酸可在不同炎症损伤局部蓄积,同时这种氨基葡萄糖具有强亲水性,其含量的增多与间质水肿的发展相平行<sup>[5]</sup>,使细胞间质压升高,二者均使注入的局部药物扩散受阻。透明质酸酶通过水解透明质酸,使间质高压迅速降低,也暂时性降低液体黏度和阻力,使注入组织中的药液迅速扩散,从而增强了药物治疗效果<sup>[6]</sup>。在甲状腺相关眼病中,组织病理学发现病变的眼眶脂肪和眼外肌中有大量糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)聚集, GAG主要由眼眶成纤维细胞产生和分泌, GAG的沉积可提高渗透压并结合大量水分从而导致眼眶组织及眼外肌间质水肿,而透明质酸是GAG的主要成分<sup>[7]</sup>,故能特异性分解透明质酸的透明质酸酶也可应用于甲状腺相关眼病的治疗。本实验在豚鼠眶周注射透明质酸酶,发现眶周结缔组织较空白对照组疏松,细胞间隙增宽。联合透明质酸酶注射组所形成的异物肉芽肿体积更小,上皮样和成纤维细胞的密度更低,中央增生的胶原纤维数量更少。

TGF- $\beta$ 系由二硫键连接组成的同种二聚体,目前共克隆出5种TGF- $\beta$ 异构体,分别命名为TGF- $\beta_1$ ~TGF- $\beta_5$ ,在哺乳动物仅有TGF- $\beta_1$ ~TGF- $\beta_3$ <sup>[8,9]</sup>。研究发现TGF- $\beta$ 为重要的促纤维化因子之一,其中作用最明显的是TGF- $\beta_1$ 。TGF- $\beta_1$ 是一种具有多种生物学效应的细胞因子。细胞因子调控异常,引起细胞因子网络紊乱,当机体组织损伤后,TGF- $\beta_1$ 可以被许多炎性细胞,如淋巴细胞、单核/巨噬细胞和血小板合成并释放,TGF- $\beta_1$ 的释放和活化促进成纤维细胞的分裂、增殖,刺激包括纤维结合蛋白在内的多种细胞外基质沉积,主要为肌腱蛋白、胶原和蛋白多糖,同时通过蛋白酶的合成及提高蛋白酶抑制剂的水平阻止细胞外基质降解,这些都有利于损伤修复,但是当TGF- $\beta_1$ 持续过度表达就会导致皮肤及脏器的纤维化疾病。可见TGF- $\beta_1$ 在损伤、炎症及纤维化之间起着

一个纽带的作用<sup>[10]</sup>。本实验TGF- $\beta_1$ 免疫组织化学染色观察表明联合透明质酸酶注射组的异物肉芽肿内TGF- $\beta_1$ 的表达量明显低于单纯曲安奈德注射组。另外,透射电镜的观察也发现单纯曲安奈德注射组成纤维细胞多为高活跃状态,而透明质酸酶注射组、联合透明质酸酶注射组成纤维细胞处于相对低活跃状态,这些都提示曲安奈德和透明质酸酶联合眶周注射,对诸如甲状腺相关眼病的患者具有使治疗作用加强,副作用减少的独到之处,并且可促进曲安奈德扩散和吸收,避免因药物蓄积所导致的异物肉芽肿反应和眼眶组织纤维化。

综上所述,联合透明质酸酶注射可促进曲安奈德的扩散、吸收,以增强其疗效并减轻异物肉芽肿的形成和延缓纤维化的进展,这为可应用眶周注射曲安奈德进行治疗的眼眶疾病,如甲状腺相关眼病、眼眶炎性假瘤等提供了一种既可增强疗效又可降低远期并发症发生率的复合性用药选择,但对于临床应用透明质酸酶的安全性以及浓度、剂量的选择尚需更多的临床实验加以探讨。

## 参 考 文 献

- 1 潘叶,孙丰源.曲安奈德在眼眶疾病中的应用.眼科新进展,2007;27(3):223-234,238.
- 2 叶青,何为民.透明质酸酶在眼科应用的研究进展.国际眼科杂志,2009;9(7):1339-1340.
- 3 杨丽萍,艾育德,李晓芳.Graves眼病局部的药物治疗.内蒙古医学杂志,2004;36(8):587-589.
- 4 Colao A, Spiezia S, Di Somma C, *et al.* Effect of GH and/or testosterone deficiency on the prostate: an ultrasonographic and endocrine study in GH-deficient adult patients. *Eur J Endocrinol*,2000;143(1):65-69.
- 5 Johnsson C, Hallgren R, Tufveson G. Role of hyaluronan in acute pancreatitis. *Surgery*,2000;127(6):650-658.
- 6 Kumar MM, Sprung J. The use of hyaluronidase to treat mannitol extravasation. *Anesth Analg*,2003;97(4):1199-1200.
- 7 Kahaly G, Forester G, Hansen C. Glycosaminoglycans in thyroid eye disease. *Thyroid*,1998;8(5):429-432.
- 8 Lawrence DA. Transforming growth factor- $\beta$ : an overview. *Kidney Int*,1995;47(suppl 49):19-23.
- 9 Barnard JA, Lyons RM, Moses HM. The cell biology of transforming growth factor  $\beta$ . *Biotic Biopsy Act*,1990;1032(1):79-87.
- 10 Scott PG, Chahary A, Tredget EE. Molecular and cellular aspects of fibrosis following thermal injury. *Hand Clin*,2000;16(2):271-281.

(2012-02-27收稿,2012-05-14修回)

编辑 吕熙