

文章编号:1004-7220(2015)01-0021-04

巩膜胚后发育过程中巩膜组织结构及生物力学特性变化

郝爽^a, 邓爱军^b, 王国辉^c

(潍坊医学院 a. 眼科学教研室, 潍坊 261031; b. 附属医院 眼科, 潍坊 261031; c. 生物科学与技术学院, 潍坊 261053)

摘要: **目的** 探讨兔巩膜组织在不同月龄期的形态结构及生物力学性能变化。**方法** 选择1、2、3月龄新西兰大白兔,取眼球,测量眼球直径和眼轴长度;获取巩膜组织,测量巩膜组织厚度,一部分巩膜组织固定后进行HE染色观察巩膜结构,一部分巩膜组织固定后通过电镜观察胶原原纤维,另一部分巩膜组织制成巩膜条带,用Instron 5544试验机检测巩膜的弹性模量。**结果** 眼球直径、眼轴长度和巩膜的厚度随月龄增加而增大。巩膜组织的弹性模量随月龄增加而增大。巩膜组织中巩膜成纤维细胞数量随月龄增加而减少,纤维束增多变粗。胶原原纤维直径随月龄增加而增大。**结论** 在巩膜胚后生长过程中,眼球和巩膜的结构不断发生变化,胶原纤维不断增多、变粗,巩膜组织的生物力学性能也随之提高,了解巩膜胚后生长发育机制可为巩膜相关疾病的防治提供理论指导。

关键词: 巩膜; 胶原原纤维; 成纤维细胞; 弹性模量

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.01.021.

Changes of scleral structures and biomechanical properties in the process of sclera post-embryonic development

HAO Shuang^a, DENG Ai-jun^b, WANG Guo-hui^c (*a. Department of Ophthalmology; b. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital; c. College of Biological Science and Technology, Weifang Medical University, Weifang 261053, China*)

Abstract: Objective To investigate the changes of morphological structures and biomechanical properties of scleral tissues in rabbits at different month ages. **Methods** The eyeballs of 1, 2 and 3 month-old New Zealand white rabbits were obtained for measuring the diameter and axial length, and the thickness of scleral tissues. Part of the scleral tissues was used to observe scleral structures with HE staining, some other part was used to observe collagen fibrils by electron microscope, and the left part were cut into strips and used to test the elastic modulus of the sclera on Instron 5544 system. **Results** The diameter, axial length of eyeballs and the thickness of the sclera were increased with month age. The elastic modulus of scleral tissues was also increased with month age. The numbers of scleral fibroblasts were decreased and the numbers of fiber bundles were increased with month age. The diameters of collagen fibrils were increased with month age. **Conclusions** In the post-embryonic stages, the structures of eyeball and sclera are changed continually, with growing numbers of thicker collagen fibers, and the biomechanical properties of scleral tissues are improved correspondingly. The mechanism of post-embryonic development in sclera is further explained in the study, which can provide theoretical guidance for prevention of sclera-related diseases.

Key words: Sclera; Collagen fibrils; Fibroblasts; Elastic modulus

收稿日期:2013-12-30; 修回日期:2014-02-06

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2012CQ005),潍坊医学院科技创新研究基金项目(K1301012)。

通信作者:王国辉,副教授, E-mail:wanguohui1983@163.com。

在出生后的胚后生长发育时期,眼球和巩膜不断生长,巩膜正常的生长发育决定眼的结构和功能不断完善,这也是巩膜葡萄肿及近视等巩膜相关疾病发生和治疗的重要时期。巩膜组织中胶原纤维和少量弹性纤维致密交错排列,决定了巩膜的结构和生物力学特性。巩膜胶原表达和积聚异常导致眼球过度扩张被认为是高度近视形成的重要机制^[1]。用电镜检查正常人的巩膜和高度近视眼后葡萄肿的巩膜发现,近视眼巩膜纤维明显变细,直径大小差别增大,内外层纤维均较正常直径小^[2-3]。在脊椎动物视觉的发育期,自身因素和视觉环境因素共同作用于视觉系统的发育,巩膜的重塑在眼正视化进程与眼球发育中起重要作用。胶原束结构、纤维直径分布和纤维形态方面的改变,导致巩膜变薄,抵抗力下降,眼轴延长^[4]。了解巩膜生长发育过程中巩膜组织结构及生物力学性能的变化,可以从新的角度解释巩膜胚后生长发育机制,为巩膜相关疾病的防治提供理论指导。本实验通过对不同月龄兔巩膜结构的观察及力学性能变化的测量,探讨兔巩膜胶原纤维、成纤维细胞在胚后生长发育过程中的变化以及对巩膜生物力学特性的影响。

1 材料与方法

1.1 巩膜组织获取

取1、2、3月龄新西兰大白兔各6只,经耳缘静脉空气栓塞处死,摘取双眼眼球,PBS缓冲液清洗干净,放入盛有PBS缓冲液的培养皿中。用眼科剪及眼科镊除去球结膜、筋膜、眼外肌等多余组织,使用游标卡尺测量眼球直径、眼轴长度。剪开眼球,剥离巩膜组织,自制组织测厚仪测量巩膜厚度。取巩膜后极部组织,以最后端为中心,切成3 mm × 10 mm的条带,于PBS缓冲液中浸润后,直接在Instron 5544试验机上进行单向拉伸破坏实验,计算巩膜弹性模量;部分巩膜组织切成3 mm × 4 mm组织块,4%多聚甲醛固定,常温保存以备制作组织切片进行HE染色;部分巩膜组织切成1 mm³组织块,以戊二醛固定,4℃保存以备制作超薄切片进行透射电镜观察。

1.2 巩膜组织弹性模量测定

将制作好的巩膜条带在Instron 5544试验机进行实验,预拉伸实验设置预循环载荷为5 mN,预循

环速度为0.15 mm/min,进行5次。拉伸破坏实验以加载速度5 mm/min逐渐增加应力,直至试件被拉断。根据计算机输出的应力-应变数据,计算巩膜弹性模量^[5-7]。

1.3 巩膜组织 HE 染色

经过4%多聚甲醛固定的组织块以60%、70%、80%、90%、95%、100%梯度乙醇脱水,各1 h,二甲苯透明2次,每次30 min。在溶蜡箱保温中,将已透明的组织块分别置于55℃软蜡Ⅰ、55℃软蜡Ⅱ、57℃软蜡Ⅲ各20 min,保证石蜡充分渗入组织中。待石蜡完全浸入组织块后,将组织块放入盛有已熔化包埋石蜡的金属包埋筐内进行包埋。蜡块完全凝固后取出蜡块,制作组织切片。行常规HE染色,封片并通过显微镜在400倍下进行观察拍照。

1.4 巩膜组织透射电镜观察

将用4%戊二醛行前固定24 h的组织块,磷酸缓冲液清洗后,用1%锇酸行后固定2 h,经磷酸缓冲液充分漂洗1 h,用50%、70%、80%、90%、100%丙酮分别脱水10 min,用Epon 812环氧树脂浸透并包埋组织块。制作超薄电镜切片并在透射电镜下观察。

1.5 统计学分析

实验数据均以均值 ± 标准差表示,所有数据采用SPSS 14.0统计学软件进行处理和统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 生长过程中眼球形态及巩膜厚度变化

不同月龄眼球直径、眼轴长度和巩膜厚度的测量结果见表1。随着月龄的增加,眼球直径、眼轴长度和巩膜厚度不断增加($P < 0.05$)。

表1 不同月龄眼球直径、眼轴长度和巩膜厚度 ($n = 12$)

Tab.1 Diameter, axis of eyeball and scleral thickness in rabbits of different month ages

年龄/月	眼球直径/mm	眼轴长度/mm	巩膜厚度/mm
1	15.1 ± 0.5	13.6 ± 0.3	0.31 ± 0.01
2	17.1 ± 0.2 *	15.7 ± 0.4 *	0.40 ± 0.01 *
3	17.7 ± 0.1 *	16.1 ± 0.1 *	0.47 ± 0.02 *

注: * $P < 0.05$,与前一月龄比较

2.2 生长过程中巩膜生物力学特性变化

根据 Instron 5544 试验机输出数据,各组巩膜弹性模量的计算结果如图 1 所示。1、2、3 月龄组的巩膜弹性模量分别为 (2.24 ± 0.08) 、 (2.39 ± 0.11) 、 (2.58 ± 0.11) MPa。随月龄增加,巩膜组织的弹性模量逐渐增大($P < 0.05$)。

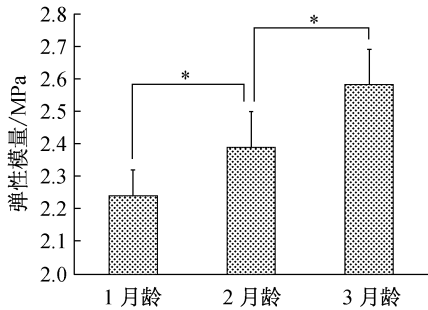


图1 不同月龄组巩膜组织弹性模量 (* $P < 0.05$)

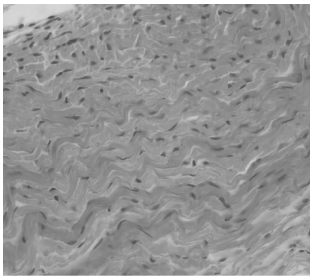
Fig.1 Elastic modulus of the sclera in rabbits of different month ages

2.3 HE 染色观察巩膜组织

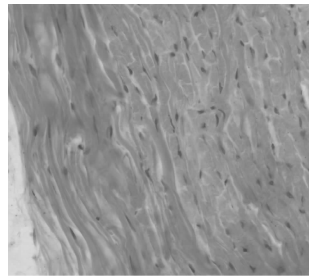
不同月龄巩膜组织经 HE 染色结果如图 2 所示。1 月龄组:巩膜成纤维细胞不规则分布在巩膜组织中,数量较多,纤维束较细;2 月龄组:巩膜成纤维细胞减少,纤维束增多、变粗;3 月龄组:巩膜成纤维细胞数量进一步减少,纤维束进一步增多、变粗。

2.4 电镜观察胶原纤维

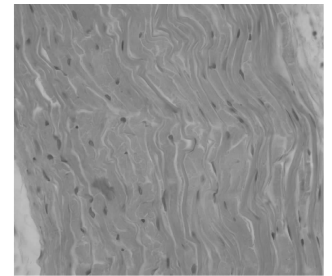
透射电镜观察不同月龄巩膜组织的胶原原纤维,结果如图 3 所示。1 月龄组:胶原原纤维的直径较小,分布着较多 56.28 ~ 77.01 nm 的细纤维和 85.89 ~ 118.47 nm 的粗纤维。2 月龄组:胶原原纤维的直径明显增大,分布着少量 74.05 ~ 140.69 nm 的细纤维和大量 192.52 ~ 259.16 nm 的粗纤维。3 月龄组:胶原原纤维的直径继续增大,分布着少量 115.51 ~ 183.64 nm 的细纤维和大量 228.06 ~ 266.57 nm 的粗纤维。



(a) 1月龄组



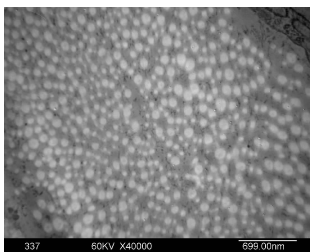
(b) 2月龄组



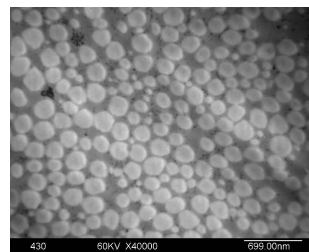
(c) 3月龄组

图2 不同月龄组巩膜组织 HE 染色结果 ($\times 400$)

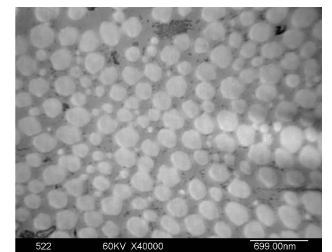
Fig.2 HE staining of the sclera in rabbits of different month ages (a) 1 month-old rabbits, (b) 2 month-old rabbit, (c) 3 month-old rabbit



(a) 1月龄组



(b) 2月龄组



(c) 3月龄组

图3 不同月龄组巩膜组织电镜图片

Fig.3 Electron microscope images of the sclera in rabbits of different month ages (a) 1 month-old rabbits, (b) 2 month-old rabbit, (c) 3 month-old rabbit

3 讨论

巩膜在维持眼球形状方面起着关键的作用,巩

膜胶原对维持巩膜的结构、功能和生物力学性质有重要作用^[8]。胶原占巩膜干重的 90%,由成纤维细胞分泌,是最主要的细胞外基质成分。哺乳动物巩

膜胶原从非成熟的小直径纤维逐渐发育成成熟的大直径纤维,直径越大代表其越成熟,抗拉伸能力越强^[9]。Bell等^[10]研究发现,巩膜厚度、胶原纤维的质量、胶原纤维之间联系的程度、周围环境的温度等因素决定个体巩膜的弹性模量。为研究后巩膜加固术后巩膜胶原含量与生物力学性能的关系,陈维毅等^[6]对兔眼进行后巩膜加固术,检测术后不同时期加固条带区巩膜胶原含量的变化,并对加固组织条带试件进行单向拉伸实验,检测其弹性模量的变化;结果发现术后加固条带区巩膜试件胶原含量随时间的增长而逐渐增加,弹性模量逐渐增大。由此可见巩膜胶原含量的变化与弹性模量的变化相对应,胶原的变化会影响巩膜的生物力学性能。本实验中也观察到随月龄增加,胶原原纤维直径增大,同时巩膜组织的厚度和弹性模量增大,巩膜成纤维细胞数量减少,说明在胚后生长发育过程中,巩膜成纤维细胞不断分泌胞外基质,使巩膜组织增厚,生物力学性能提高,而巩膜组织趋于稳定后,巩膜成纤维细胞数量减少。

在胚胎发育早期,多数未成熟的小直径胶原位于后极部巩膜,巩膜后极部胶原最晚成熟,出生后后极部巩膜胶原合成最活跃,导致后极部抗拉伸能力弱,这可能是高度近视眼易发生后巩膜葡萄肿的原因。Kang等^[11]研究树鼠实验性近视眼的形态学改变,发现其巩膜厚度变薄,纤维直径变小。目前普遍认为,近视是由于眼轴的过度延长所致,是遗传因素和环境因素共同作用引起巩膜胶原的产生和降解异常,造成巩膜变薄,相对不能承受眼内压而扩张,进而引起眼球形态改变^[12]。

由于巩膜及巩膜成纤维细胞所处生理环境(包括生物学环境和力学环境)及自身生物性质和力学特性的复杂性,为了解巩膜生理、病理变化机制,就要从力学-生物学角度系统全面地对巩膜及巩膜成纤维细胞进行研究、探索和分析^[8]。实验表明,力学刺激能够影响巩膜成纤维细胞生物学行为的改变,这些改变将影响胞外基质的表达及胶原纤维的多少及空间排列,从而影响巩膜以及眼球的结构和功能^[13]。细胞在力学性能上很弱,细胞外基质对组织的强度起着关键作用,其中胶原纤维具有拉伸增强作用,当胶原纤维排列方向与外加应力方向相近时,这些外加的力将被纤维中的恢复应力所抵

抗^[14]。器官的生物力学特性取决于它的组织结构,生理情况下,各器官胶原纤维排列方式不同,但其排列方式均与器官功能相适应。在生长发育、创伤修复和某些病理过程中,由于应力的变化,胶原纤维的合成与聚合发生适应性改变,包括数量和直径变化、各型胶原含量变化和空间排列的重建,从而引起器官力学性质变化。总之,胶原纤维的多少、粗细、排列直接影响器官的力学性质;反之,器官力学性质的改变对胶原纤维的形成也有调节作用^[15]。

参考文献:

- [1] 李玲,郭宏,白云. 高度近视相关胶原基因的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2012, 35(2): 106-110.
- [2] Curtin BJ, Iwamoto T, Renaldo DP. Normal and staphylococcal sclera of high myopia: An electron microscopic study [J]. Arch Ophthalmol, 1979, 97(5): 912-915.
- [3] Liu KR, Chen MS, Ko LS. Electron microscopic studies of the scleral collagen fiber in excessively high myopia [J]. J Formosan Med Assoc, 1986, 85(11): 1032-1038.
- [4] Obata H, Kaburaki T, Kato M, et al. Expression of TGF-beta type I and type II receptors in rat eyes [J]. Curr Eye Res, 1996, 15(3): 335-340.
- [5] 王晓君,陈维毅. 后巩膜加固术后巩膜生物力学性能的研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, 24(6): 1260-1263.
- [6] Chen WY, Wang XJ, Wang CY, et al. An experimental study on collagen content and biomechanical properties of sclera after posterior sclera reinforcement [J]. Clin Biomech, 2008, 23(1): 17-20.
- [7] 于海群,张泳,陶祥臣,等. 兔眼紫外交联术去上皮与保留上皮的角膜生物力学差异性研 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2012, 50(4): 80-82.
- [8] 王国辉,陈维毅,李晓娜. 巩膜及巩膜成纤维细胞的生物力学研究进展[J]. 医用生物力学, 2010, 25(3): 230-234. Wang GH, Chen WY, Li XN. Advances in biomechanical study of sclera and scleral fibroblasts [J]. J Med Biomech, 2010, 25(3): 230-234.
- [9] 邹蕾蕾,黄莉雯,刘红. 近视与巩膜胶原关系的研究进展[J]. 中国耳鼻咽喉科杂志, 2013, 13(1): 57-59.
- [10] Bell GR, Ed MS. Biomechanical considerations of high myopia: Part I -physiological characteristics [J]. J Am Optom Assoc, 1993, 64(5): 332-338.
- [11] Kang RN, Norton TT. Alteration of scleral morphology in tree shrews with induced myopia [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(suppl): 1209.