

蒋波,田莎,李涛,等. 石斛酚抑制碱烧伤大鼠角膜新生血管的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 846-855.
JIANG B, TIAN S, LI T, et al. Experimental study of the inhibition of gigantol on corneal neovascularization in rats by alkali burn [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 846-855.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.004

石斛酚抑制碱烧伤大鼠角膜新生血管的实验研究

蒋波^{1,2}, 田莎¹, 李涛¹, 李春霞³, 周晓东^{1*}

(1. 复旦大学附属金山医院眼科, 上海 201508; 2. 上海中医药大学, 上海 201203;
3. 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院眼科, 上海 200082)

【摘要】 目的 探讨石斛酚抑制碱烧伤大鼠角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 的作用。方法 构建 SD 大鼠角膜碱烧伤模型, 随机分成正常对照组、模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组, 每组各 10 只。低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组分别于伤后第 1 天结膜下注射 2.5 mg/0.05 mL、5 mg/0.05 mL 石斛酚, 2 mg/0.05 mL 阿柏西普。伤后第 3、7、14 天, 观察并计算角膜新生血管占全角膜面积的百分比、角膜混浊评分并测量角膜厚度。碱烧伤第 14 天, 处死全部大鼠, 通过苏木素-伊红 (HE) 染色和免疫组化观察角膜组织中 VEGF 和 CD34 蛋白表达水平, 以及通过 ELISA 检测各组 VEGF、IL-1 β 、TNF- α 的蛋白含量。结果 碱烧伤后第 7、14 天, 低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜新生血管面积占全角膜面积百分比均显著低于模型对照组 (所有 $P < 0.05$)。碱烧伤后第 14 天, 高浓度石斛酚组角膜混浊评分显著小于模型对照组 ($P < 0.05$), 模型对照组、低浓度石斛酚组角膜厚度均显著高于正常对照组 (所有 $P < 0.001$)。但是, 高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度与正常对照组相比较, 均无显著性差异 (所有 $P > 0.05$)。此外, 低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜组织中 VEGF、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达均显著低于模型对照组 (所有 $P < 0.01$)。结论 结膜下注射石斛酚对碱烧伤大鼠角膜新生血管有抑制作用, 并能促进角膜水肿的吸收。

【关键词】 石斛酚; 阿柏西普; 碱烧伤; 角膜新生血管; VEGF

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847 (2024) 07-0846-10

Experimental study of the inhibition of gigantol on corneal neovascularization in rats by alkali burn

JIANG Bo^{1,2}, TIAN Sha¹, LI Tao¹, LI Chunxia³, ZHOU Xiaodong^{1*}

(1. Department of Ophthalmology, Jinshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508, China;
2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Department of Ophthalmology, Shanghai Hospital of Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China)
Corresponding author: ZHOU Xiaodong. E-mail: xdzhou_2013@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the inhibition of gigantol on corneal neovascularization (CNV) in rats after corneal alkali burn. **Methods** Animal models of corneal alkali burn were made with SD rats, which were divided into normal control group, model control group, low-concentration gigantol group, high-concentration gigantol group and aflibercept group, with 10 rats in each group. The rats in low-concentration gigantol group, high-concentration gigantol group and aflibercept group were treated with 2.5 mg/0.05 mL gigantol, 5 mg/0.05 mL gigantol, and 2 mg/0.05 mL

【基金项目】上海市金山区医药卫生科技创新资金项目 (2022-WS-14), 上海市虹口区第二轮“国医强优”三年行动计划 (2022-2024) (HKGYQYXM-2022-13)。

Funded by Shanghai Jinshan District Medical and Health Science and Technology Innovation Funding Program (2022-WS-14), “National Medicine Strong and Excellent” Three-Year-Action Plan of Shanghai Hongkou District (2022-2024) (HKGYQYXM-2022-13)

【作者简介】蒋波, 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 眼部化学烧伤。Email: jb19811119@sina.com

【通信作者】周晓东, 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 近视相关的基础研究。Email: xdzhou_2013@163.com

afilibercept by subconjunctival injection after modeling. The CNV, corneal opacity score, and thickness of the cornea were observed and compared on the 3rd, 7th, and 14th days after alkali burn. The ratio of CNV area to corneal area was calculated. On the 14th day, all rats were sacrificed. Hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry were used to detect the expression of CD34 and VEGF. The protein expression of VEGF, IL-1 β , and TNF- α was detected by ELISA.

Results On the 7th and 14th days after alkali burn, the percentages of CNV to total corneal area in low-concentration gigantol group, high-concentration gigantol group and aflibercept group were significantly smaller than those in model control group (all $P < 0.05$). On the 14th day, the corneal opacity score was lower in high-concentration gigantol group than model control group ($P < 0.05$). The corneal thickness in model control group and low-concentration gigantol group were significantly greater than that in normal control group (all $P < 0.001$). However, the corneal thickness in high-concentration gigantol group and aflibercept group were not significantly different from that in normal control group (all $P > 0.05$). In addition, the protein expression of VEGF, IL-1 β , and TNF- α in corneal tissues in low-concentration gigantol group, high-concentration gigantol group and aflibercept group were significantly lower than that in model control group (all $P < 0.01$). **Conclusions** Gigantol administration by subconjunctival injection can inhibit the formation of CNV in rats after alkali burn and promote absorption of the corneal edema.

[Keywords] gigantol; aflibercept; alkali burn; corneal neovascularization; VEGF

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

角膜碱性烧伤是临床常见的眼部外伤,可引起角膜上皮脱落、角膜云翳或斑翳的形成,甚至角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 的形成,导致角膜透明度下降,影响患者的视功能,严重者还将导致角膜溃疡或角膜穿孔。在角膜损伤以及修复的病理过程中, CNV 发挥着重要的作用,抑制 CNV 的产生是预后的关键。研究证实,血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在 CNV 形成的过程中起到了非常重要的作用,可以促进血管内皮细胞迁移、增殖,诱导新生血管形成,应用抗 VEGF 药物可以有效抑制 CNV 的形成^[1]。石斛酚是一种从石斛中提取出的联苈类化合物,能抑制 VEGF 表达,减少视网膜新生血管的形成^[2-3],但石斛酚对角膜新生血管的研究尚未有报道。本研究通过结膜下注射不同剂量的石斛酚,观察其对碱性烧伤诱导的 CNV 模型的抑制作用,为角膜碱性烧伤的治疗提供进一步的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 50 只 6 ~ 8 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 200 ~ 220 g,购于上海吉辉实验动物饲养有限公司【SCXK(沪)2022-0009】。昼夜各半循环照明,相对湿度 40% ~ 60%,温度控制在 22 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,饲养于上海市公共卫生临床中心动物实验室【SYXK(沪)2020-0019】。本研究已在上海市公卫临床中心获得动物伦理审查批准(2023-A044-01 号)。

1.1.2 主要试剂与仪器

石斛酚(成都普思生物科技有限公司),阿柏西普眼内注射液(EYLEA,拜耳公司,德国),VEGF、IL-1 β 、TNF- α ELISA 检测试剂盒(上海优选生物科技有限公司),VEGF 抗体、CD34 抗体、山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG(武汉赛维尔生物科技有限公司)。裂隙灯显微镜照相系统(Topcon SL-D7,日本),光学相关断层扫描仪(蔡司 Cirrus-HD 4000,德国)。

1.2 方法

1.2.1 制作大鼠角膜碱烧伤动物模型

造模前,通过裂隙灯显微镜检查大鼠角膜等眼前节结构正常,排除眼前节及眼附属器病变。将大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组,每组各 10 只,取每组大鼠的右眼构建角膜碱烧伤模型。麻醉成功后,在 1 mol/L NaOH 溶液中浸泡直径 3 mm 的圆形滤纸片,持续 1 min,然后将滤纸片蘸去多余的液体,放置于大鼠角膜中央部位烧灼 30 s,然后快速用生理盐水冲洗角膜和结膜囊 1 min,以去除残留的 NaOH 溶液。裂隙灯下观察见角膜中央明显混浊水肿,周边角膜隐约透见前房和虹膜即为造模成功。排除角膜感染、角膜穿孔和前房严重积血的大鼠。

1.2.2 药物干预

低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组于造模后当日结膜下注射药物进行干预,距角膜缘 1 mm 处分 4 个象限进行注射。低浓度石斛酚组结膜下注射石斛酚 2.5 mg/0.05 mL,高浓度石斛酚组结膜下注射石斛酚 5 mg/0.05 mL,阿柏西普组结

膜下注射阿柏西普 2 mg/0.05 mL。4 组大鼠于造模当日开始给予左氧氟沙星滴眼液滴眼每日 3 次,预防感染。

1.2.3 角膜拍照和计算 CNV 面积

每组大鼠于碱烧伤后第 3、7、14 天麻醉后,通过裂隙灯显微镜观察 CNV 生长范围、角膜水肿程度以及前房有无出血等情况并进行拍照。通过 Image J 1.53 t 软件计算角膜新生血管面积占全角膜面积百分比。

1.2.4 角膜混浊评分

裂隙灯显微镜下观察角膜混浊程度并评分,参照 Holland 角膜混浊评分标准^[4]:0 分:角膜透明,前房内虹膜和瞳孔清晰可见;1 分:角膜轻度混浊,可见虹膜纹理和瞳孔;2 分:角膜混浊较重,虹膜纹理不清;3 分:角膜混浊明显,虹膜纹理不清,但隐约可见瞳孔;4 分:角膜完全混浊,虹膜和瞳孔看不清。

1.2.5 角膜厚度测量

每组大鼠分别于碱烧伤后第 3、7、14 天麻醉后,使用眼前段相干光断层扫描仪进行水平扫描,测量角膜中央厚度。

1.2.6 苏木素-伊红 (HE) 染色与免疫组织化学检测

于造模后第 14 天,将大鼠处死后,取完整角膜,用无菌剪刀沿角膜中央将角膜平均剪成两份:一份角膜标本保存在 -80 °C 冰箱中行 ELISA 备用;另一份角膜标本在 4% 多聚甲醛溶液中浸泡固定 24 h,取出后石蜡包埋,石蜡块 4 μm 厚度进行切片,HE 染色观察角膜组织各层结构。切片脱蜡至水,抗原修复,置于 3% H₂O₂ 溶液,室温孵育 25 min,水洗 3 次,分别滴加一抗 (VEGF 1:400、CD34 1:50),4 °C 孵育过夜,分别滴加二抗 (山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG),室温孵育 30 min,DAB 显色,复染细胞核,脱水封片,于高倍显微镜下观察切片并拍照。

1.2.7 ELISA

将保存在 -80 °C 冰箱中的角膜组织标本通过 ELISA 测定 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白含量。将角膜组织进行剪碎,裂解后研磨离心,取上清液置于 Ep 管中,按照 ELISA 试剂盒的操作说明书来进行 ELISA 检测,用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值,计算样品浓度。

1.3 统计学分析

用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析及处理,检验均设置检验水准 α 为 0.05。服从正态分布且

方差齐性数据用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,反之则用中位数 (下四分位数 ~ 上四分位数) [M(Q25 ~ 75)] 的方式进行描述。首先对各个评价指标按分组情况进行数据组间分布的正态性检验,然后采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 方法进行多组间数据比较,若方差齐性,则通过 LSD 方法进行两组间比较;若方差不齐,则使用 Tamhane's T2 检验进行两组间事后检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯显微镜下观察 CNV

通过裂隙灯显微镜观察 CNV,正常对照组大鼠角膜透明、无 CNV 生长,角膜缘血管无扩张,前房和虹膜清晰可见。大鼠角膜碱烧伤后第 3 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组均可见角膜基质水肿混浊明显,角巩膜缘处可见血管充血扩张,模型对照组、低浓度石斛酚组可见少许新生血管呈毛刷状生长。碱烧伤后第 7 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组均可见角膜新生血管,由角膜缘向角膜中间蔓延,模型对照组、低浓度石斛酚组新生血管生长致密,高浓度石斛酚组、阿柏西普组新生血管相对较稀疏,且生长缓慢;模型对照组 3 例大鼠出现前房积血。碱烧伤后第 14 天,模型对照组新生血管面积较广泛,CNV 生长致密,部分 CNV 长入角膜瞳孔区,角膜依旧混浊,虹膜、前房不清;高浓度石斛酚组、阿柏西普组新生血管分布稀疏,角膜轻度水肿,虹膜可见;低浓度石斛酚组较高浓度石斛酚组、阿柏西普组新生血管的长度、范围以及数量均略重 (见图 1)。

2.2 CNV 面积占全角膜面积的百分比

应用 Image J 1.53 t 软件分别于碱烧伤后第 3、7、14 天,测量各组 CNV 面积和全角膜面积,并计算两者的比率,结果如表 1 所示:碱烧伤后第 3 天,高浓度石斛酚组、阿柏西普组 CNV 面积百分比均显著小于模型对照组 (所有 $P < 0.01$);碱烧伤后第 7 天,低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组 CNV 面积百分比均显著小于模型对照组 (所有 $P < 0.05$);碱烧伤后第 14 天,低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组 CNV 面积百分比均显著小于模型对照组 (所有 $P < 0.01$)。低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组之间 CNV 面积百分比相比较均不具有显著性差异 (所有 $P > 0.05$)。

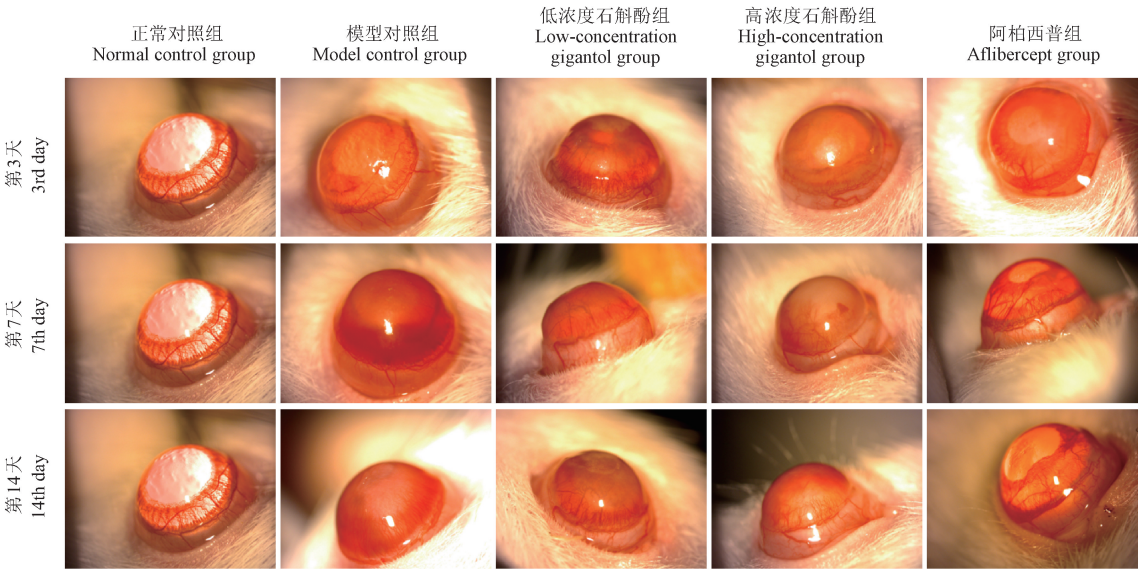


图 1 大鼠角膜碱烧伤后 CNV 情况
Figure 1 CNV after corneal alkali burn in rats

表 1 碱烧伤大鼠 CNV 占全角膜百分比($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Percentage of CNV to total cornea after alkali burn in rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	第 3 天 3rd day	第 7 天 7th day	第 14 天 14th day
模型对照组 Model control group	17.70 $\pm$ 4.57	25.61 $\pm$ 11.42	33.57 $\pm$ 18.85
低浓度石斛酚组 Low-concentration gigantol group	13.78 $\pm$ 5.11	14.75 $\pm$ 12.11 *	16.33 $\pm$ 10.43 **
高浓度石斛酚组 High-concentration gigantol group	9.69 $\pm$ 5.11 **	11.30 $\pm$ 3.75 **	10.93 $\pm$ 5.97 ***
阿柏西普组 Aflibercept group	9.16 $\pm$ 2.76 **	12.57 $\pm$ 5.19 **	11.80 $\pm$ 9.40 ***

注:与模型对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下表同)
Note. Compared with model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following tables)

2.3 角膜混浊评分

碱烧伤后第 3 天和第 7 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组各组间角膜混浊评分相比较均不具有显著性差异 ($P > 0.05$);碱烧伤后第 14 天,高浓度石斛酚组角膜混浊评分显著低于模型对照组 ($P < 0.05$) (见表 2)。

2.4 OCT 测量角膜厚度

通过 OCT 测量各组大鼠不同时间点的角膜厚度见图 2。碱烧伤后第 3 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度均显著高于正常对照组 (所有 $P < 0.001$);碱烧伤后第 7 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度均显著高于正常对照组 (所有 $P < 0.001$),高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度均显著小于模型对照组 (所有 $P < 0.01$);碱

烧伤后第 14 天,模型对照组、低浓度石斛酚组角膜厚度均显著高于正常对照组 (所有 $P < 0.001$);高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度与正常对照组均不具有显著性差异 (所有 $P > 0.05$);高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度显著均小于模型对照组 (所有 $P < 0.001$) (表 3)。

2.5 常规病理切片观察

正常对照组大鼠角膜透明,各层结构清晰完整,HE 染色未见角膜新生血管长入。碱烧伤后第 14 天,模型对照组可见角膜层间较多新生血管,管腔内粘附较多红细胞,并可见大量炎性细胞浸润;低浓度石斛酚组可见角膜基质散在炎性细胞浸润及新生血管;高浓度石斛酚组、阿柏西普组可见角膜各层结构尚规则,基质层水肿较轻,层间可见少量炎性细胞浸润,新生血管较少 (见图 3)。

表 2 碱烧伤大鼠角膜混浊评分($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	第 3 天 3rd day	第 7 天 7th day	第 14 天 14th day
模型对照组 Model control group	2.30 ± 0.48	2.90 ± 0.74	3.10 ± 0.88
低浓度石斛酚组 Low-concentration gigantol group	2.20 ± 0.42	2.60 ± 0.70	2.40 ± 0.97
高浓度石斛酚组 High-concentration gigantol group	2.30 ± 0.48	2.40 ± 0.97	2.10 ± 1.10 *
阿柏西普组 Aflibercept group	2.40 ± 0.52	2.70 ± 0.82	2.20 ± 1.03

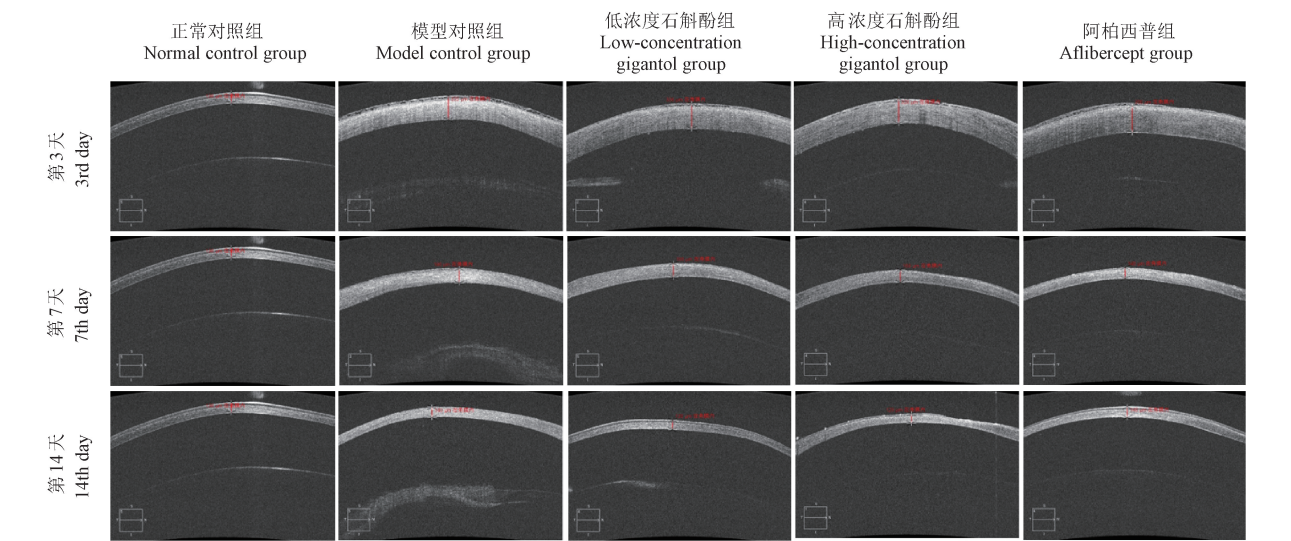


图 2 大鼠角膜碱烧伤后角膜厚度

Figure 2 Corneal thicknes after corneal alkali burn in rats

表 3 碱烧伤大鼠不同时间点角膜厚度($\bar{x} \pm s, n = 10, \mu\text{m}$)

组别 Groups	第 3 天 3rd day	第 7 天 7th day	第 14 天 14th day
正常对照组 Normal control group	129.60 ± 7.11	129.60 ± 7.11	129.60 ± 7.11
模型对照组 Model control group	336.80 ± 19.12 ^{###}	182.00 ± 20.68 ^{###}	149.20 ± 10.16 ^{###}
低浓度石斛酚组 Low-concentration gigantol group	313.60 ± 42.00 ^{###}	177.20 ± 13.73 ^{###}	144.80 ± 9.58 ^{###}
高浓度石斛酚组 High-concentration gigantol group	318.80 ± 25.16 ^{###}	156.80 ± 11.12 ^{### ***}	134.40 ± 5.40 ^{***}
阿柏西普组 Aflibercept group	326.80 ± 29.52 ^{###}	160.40 ± 12.29 ^{### **}	135.20 ± 8.39 ^{***}

注:与正常对照组相比,### $P < 0.001$ 。(下表同)
Note. Compared with normal control group, ### $P < 0.001$. (The same in the following tables)

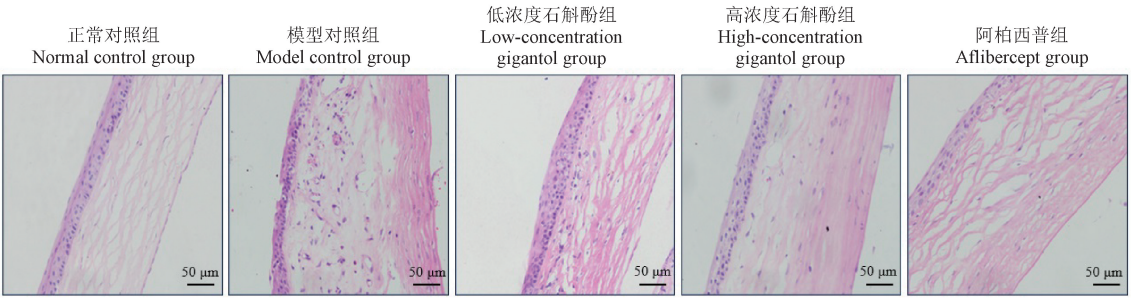


图 3 碱烧伤后第 14 天角膜组织 HE 染色图

Figure 3 HE staining of corneal tissues of rats in each group on 14th day after alkali burn

2.6 免疫组化检测角膜组织中 VEGF 与 CD34 蛋白的表达

正常对照组大鼠 VEGF 蛋白在角膜上皮细胞胞质呈弱阳性表达,CD34 蛋白在角膜上皮层、角膜基质层均表达不明显。碱烧伤第 14 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜组织中 VEGF 蛋白和 CD34 蛋白均表达增强,呈棕黄色或棕褐色颗粒分布。VEGF 蛋白主要定位于角膜上皮细胞、基质层炎症细胞胞质以及新生血管管壁,CD34 蛋白主要定位于角膜基质层新生血管内皮细胞,呈强阳性表达,角膜上皮细胞胞质以及炎症细胞呈阳性表达。其中模型对照组 VEGF 和 CD34 蛋白表达最强,CNV 致密,染色面积广泛;低

浓度石斛酚组 CNV 较多,VEGF 和 CD34 蛋白表达较强,但与模型对照组相比略低;高浓度石斛酚组、阿柏西普组可见较稀疏的 CNV,VEGF 和 CD34 蛋白表达与模型对照组和低浓度石斛酚组相比明显偏低(图 4)。

2.7 ELISA 检测各组大鼠角膜组织中 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白含量

碱烧伤后第 14 天,通过 ELISA 检测各组碱烧伤大鼠角膜组织中 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白含量。结果如下:模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜中 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白表达均显著高于正常对照组(所有 $P < 0.01$),低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜

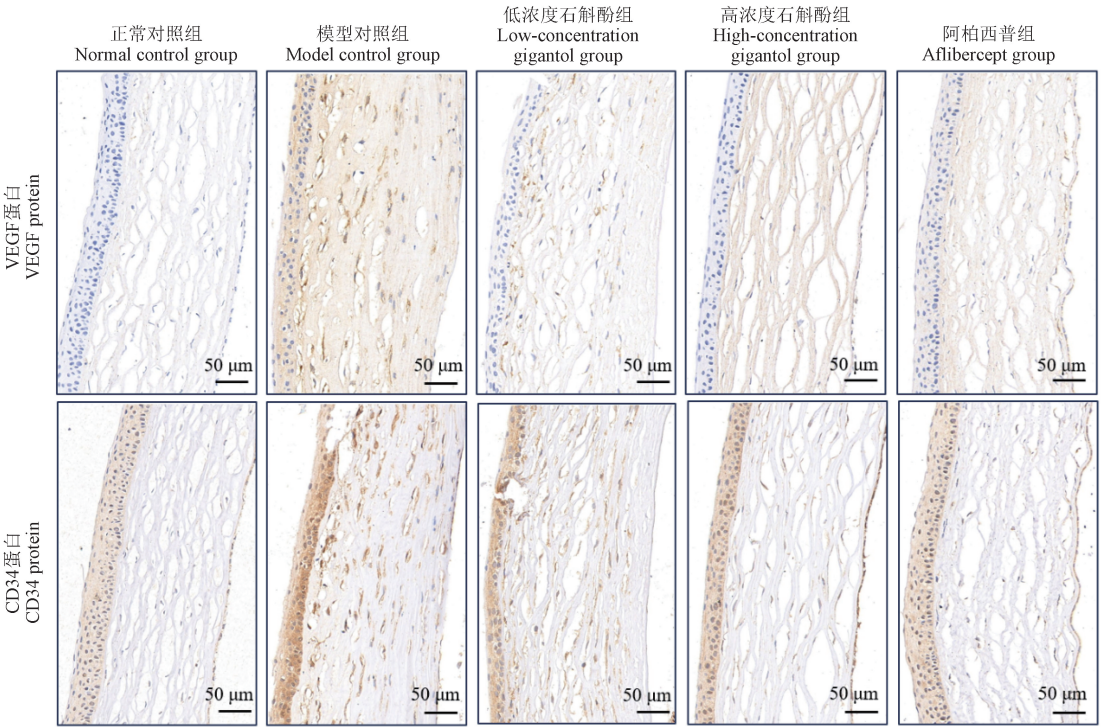


图 4 角膜碱烧伤后第 14 天角膜组织中 VEGF 与 CD34 蛋白表达

Figure 4 Expression of VEGF and CD34 protein in the corneal tissues on 14th day after corneal alkali burn

中 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白表达均显著低于模型对照组(所有 $P < 0.01$)(表 4)。

2.8 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白表达与 CNV、角膜混浊评分和角膜厚度的相关性分析

将角膜组织中 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白表达量与 CNV、角膜混浊评分和角膜厚度分别进行 Pearson 相关分析后显示:VEGF 与 CNV 呈显著正相关($r = 0.530, P < 0.001$),与角膜混浊评分无显著相关

($r = 0.037, P = 0.823$),与角膜厚度呈显著正相关($r = 0.484, P = 0.002$);IL-1β 与 CNV 呈显著正相关($r = 0.468, P = 0.002$),与角膜混浊评分无显著相关($r = 0.236, P = 0.143$),与角膜厚度呈显著正相关($r = 0.383, P = 0.015$);TNF-α 与 CNV 呈显著正相关($r = 0.434, P = 0.005$),与角膜混浊评分呈显著正相关($r = 0.455, P = 0.003$),与角膜厚度呈显著正相关($r = 0.502, P = 0.001$)。

表 4 碱烧伤大鼠角膜组织中 VEGF、IL-1β、TNF-α 的蛋白含量($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)
Table 4 Protein levels of VEGF, IL-1β, and TNF-α in corneal tissues of alkali burned rats($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

组别 Groups	VEGF 蛋白 VEGF protein	IL-1β 蛋白 IL-1β protein	TNF-α 蛋白 TNF-α protein
正常对照组 Normal control group	99.43 ± 8.90	71.89 ± 7.79	170.40 ± 12.74
模型对照组 Model control group	180.68 ± 13.58 ^{###}	128.80 ± 14.52 ^{###}	304.61 ± 17.28 ^{###}
低浓度石斛酚组 Low-concentration giganol group	162.76 ± 9.93 ^{### **}	105.91 ± 8.57 ^{### **}	269.87 ± 11.23 ^{### **}
高浓度石斛酚组 High-concentration giganol group	141.17 ± 12.74 ^{### **}	88.99 ± 8.30 ^{### **}	237.92 ± 18.73 ^{### **}
阿柏西普组 Aflibercept group	135.13 ± 13.32 ^{### **}	87.81 ± 10.75 ^{### **}	242.95 ± 18.74 ^{### **}

注:与正常对照组相比,^{##} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with normal control group,^{##} $P < 0.01$.

3 讨论

在角膜损伤愈合过程中,坏死的细胞会释放各种内源性因子,趋化炎症细胞迅速迁移进入受损的组织,进而产生过度的免疫炎症反应,导致角膜新生血管形成、基质纤维化、角膜溃疡等不良后果的发生^[5-6]。IL-1β 在炎症反应早期即可合成和释放,可以趋化多种炎症细胞来发挥作用,与碱烧伤后角膜炎症反应呈正相关^[7-9]。TNF-α 是一种主要由激活的巨噬细胞、单核细胞分泌的多能性炎症因子,在角膜烧伤反应中可以增加炎症细胞因子的水平,加重炎症反应,引起角膜组织进行性坏死、导致角膜溃疡的发生^[10-11]。徐小芹^[12]发现碱烧伤组大鼠角膜和房水中 IL-1、TNF-α 的蛋白表达量均显著高于对照组。张雷等^[13]也发现碱烧伤模型组大鼠房水中 IL-1、TNF-α 的蛋白表达量均显著高于正常对照组。在本实验中,碱烧伤后第 14 天角膜组织中 IL-1β、TNF-α 的表达明显升高,进一步证实了 IL-1β、TNF-α 在碱烧伤后角膜炎症反应中发挥了重要作用。同时,多种细胞生长因子在角膜损伤及修复过程中也起到了重要作用,如成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)、VEGF、转化生长因子

(transforming growth factors,TGF)等,可促进角膜上皮细胞的迁移、增殖,加速角膜上皮修复、角膜基质纤维化,但同时还可以促进 CNV 的形成^[14-16],尤其是 VEGF 在 CNV 的形成过程中起到了至为关键的作用。VEGF 是血小板源性生长因子基因家族的成员,通过与内皮细胞表面受体 VEGFR-1、VEGFR-2 结合,激活细胞内酪氨酸激酶,触发一系列的信号通路,引起角膜缘血管扩张、血管渗透性增强,促使血管内皮细胞迁移至角膜基质中并繁殖,导致新生血管形成^[17-19]。既往研究已证实,在角膜碱烧伤后新生血管的发生、发展中,VEGF 发挥了重要作用^[20-21]。本实验中,碱烧伤后 14 d 角膜组织高表达 VEGF,且与角膜新生血管面积呈正相关。CD34 是由糖蛋白组成的抗原,被认为是重复性好、稳定性高、较理想的血管内皮标记物,主要表达于微血管的内皮细胞内,是新生血管计数的良好指标^[22-23]。张慧等^[24]报道,碱烧伤后第 14 天,角膜中 CD34 表达增加。在本研究中,碱烧伤后第 14 天,通过免疫组化检查结果发现,与正常对照组角膜相比较,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜中的 CD34 染色增加,表达增强,与张慧等^[24]研究结果相似。

石斛是我国传统珍贵药材,具有益气养阴、清热明目等功效。石斛酚是一种从石斛中提取出的酚类化合物,具有抗炎、抗氧化、调节免疫、抗肿瘤等生物活性^[25],此外,石斛酚对视网膜新生血管也有抑制作用。张梅等^[2]发现石斛酚通过抑制醛糖还原酶(aldose reductase, AR)通路和氧化应激反应,从而抑制视网膜 VEGF 的表达,减少新生血管形成。YU 等^[26]研究亦发现石斛酚能减少视网膜新生血管的生成,考虑与石斛酚通过阻断 Erk1/2 介导的视网膜内皮细胞和小胶质细胞中 HIF1 α 的激活,降低 VEGF 表达,抑制了 VEGFR2 受体及其下游信号通路的激活有关。阿柏西普是一种同源二聚体糖蛋白,不仅结合 VEGF-A,还可以结合血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF),因此具有较强的抑制新生血管形成的功能,且生物活性持久^[27-28],临床广泛应用于老年性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、视网膜静脉阻塞等眼底疾病的治疗^[29]。本实验中,观察到在角膜碱烧伤后第 14 天,ELISA 和免疫组化检测均发现:与正常对照组相比,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜组织中 VEGF 蛋白均表达明显增强,其中低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组和阿柏西普组 VEGF 蛋白阳性表达较模型对照组偏低,而且,碱烧伤第 3、7、14 天,低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组 CNV 面积百分比均显著小于模型对照组,证明结膜下分别注射石斛酚和阿柏西普均能够降低 VEGF 的表达,抑制 CNV 的形成,因此,在碱烧伤角膜修复过程中,抑制 VEGF 表达是抑制新生血管生成的关键所在。

相干光断层扫描(optical coherence tomography, OCT)是一种非接触的光学诊断技术,可用于活体眼组织显微结构观察,临床多应用于眼底黄斑和视盘等相关疾病的诊断,除此之外,OCT 在眼前节疾病中的应用越来越广泛,如观察圆锥角膜、角膜移植、屈光手术中角膜瓣、干眼等。前期研究发现,通过 OCT 观察眼化学伤治疗前后角膜厚度的变化,可以清晰、直观地显示角膜水肿消退、瘢痕化形成的过程^[30-31]。在本实验中,通过 OCT 测量碱烧伤大鼠在不同时间点的角膜厚度,结果发现在碱烧伤后第 3 天各组角膜明显水肿、厚度增加,碱烧伤第 7 天各组角膜水肿较前减轻,碱烧伤第 14 天,模型对照组、低浓度石斛酚组角膜较正常对照组角膜增厚,表明仍存在不同程度角膜水肿,高浓度石斛酚组、阿柏

西普组角膜厚度与正常对照组无显著性差异。而且碱烧伤第 14 天,高浓度石斛酚组的角膜混浊评分也显著低于模型对照组,因此,石斛酚和阿柏西普在抑制角膜新生血管形成的同时,还减轻了角膜水肿的程度,促进了角膜混浊的减退,对角膜损伤的修复产生了积极促进作用,推测可能的机制是由于这两种药物通过抑制 IL-1、TNF- α 的表达,激活角膜内的 Na⁺/K⁺ ATP 酶的“泵”功能,促使角膜基质的水分泵入前房;同时,这两种药物抑制了角膜新生血管的生成,导致毛细血管渗透性降低,从而减少了角膜基质内液体的积聚。

角膜碱烧伤后,抑制角膜新生血管的生成是预后的关键。在本研究中,首次通过结膜下注射石斛酚观察碱烧伤后 CNV 及炎症因子的表达,证实石斛酚与经典抗 VEGF 药物阿柏西普具有相当的效果,均可以减少碱烧伤引起的 CNV 的面积,促进角膜水肿的吸收,且高浓度石斛酚较低浓度石斛酚具有更好的效果,这为探索碱烧伤提供了新的治疗方法和思路,但石斛酚最佳的有效浓度以及是否呈剂量依赖性仍需进一步的研究。同时,通过 OCT 观察角膜厚度、角膜水肿在不同实验阶段的变化,为探索碱烧伤预后提供了更合理、更方便、更无创的检测手段。

参 考 文 献(References)

- [1] 龚雨婷,王林农. 角膜新生血管抗血管内皮生长因子治疗新途径[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2022, 22(4): 409-412.
GONG Y T, WANG L N. New approaches to anti-vascular endothelial growth factor treatment for corneal neovascularization [J]. Chin J Ophthalmol Otorhinolaryngol, 2022, 22(4): 409-412.
- [2] 张梅,李春霞,韦芳,等. 石斛酚对高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞的保护作用[J]. 国际眼科杂志, 2019, 19(2): 209-213.
ZHANG M, LI C X, WEI F, et al. Protective effect of gigantolon human retinal microvascular endothelial cells induced by high glucose [J]. Int Eye Sci, 2019, 19(2): 209-213.
- [3] 俞越,李春霞,史春. 石斛提取物与糖尿病视网膜病变相关研究进展[J]. 中国中医眼科杂志, 2021, 31(3): 215-217, 223.
YU Y, LI C X, SHI C. Advances in research on extracts of dendrobium and diabetic retinopathy [J]. Chin J Chin Ophthalmol, 2021, 31(3): 215-217, 223.
- [4] HOLLAND E J, CHAN C C, WETZIG R P, et al. Clinical and immunohistologic studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model [J]. Cornea, 1991, 10(5): 374-380.
- [5] WATAKE A, MURAKAMI A, EBIHARA N. The expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in corneal

- fibroblasts by alarmins from necrotic corneal epithelial cells [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2018, 62(1): 92–100.
- [6] FUKUDA K, ISHIDA W, MIURA Y, et al. Cytokine expression and barrier disruption in human corneal epithelial cells induced by alarmin released from necrotic cells [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2017, 61(5): 415–422.
- [7] WEI J, JIANG H, GAO H, et al. Blocking mammalian target of rapamycin (mTOR) attenuates HIF-1 α pathways engaged-vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(6): 1570–1577.
- [8] 石玉荣, 吴军录, 权文强, 等. IL-1 β 促进肺癌细胞增殖的作用机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(1): 20–24.
- SHI Y R, WU J L, QUAN W Q, et al. Study on mechanisms of IL-1 β promoted lung cancer cells proliferation [J]. *Chin J Immunol*, 2017, 33(1): 20–24.
- [9] SOTOZONO C, HE J, MATSUMOTO Y, et al. Cytokine expression in the alkali-burned cornea [J]. *Curr Eye Res*, 1997, 16(7): 670–676.
- [10] CHENG L, YU H, YAN N, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α target genes contribute to retinal neuroprotection [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 20.
- [11] 付馨余, 邹文进, 喻谦, 等. 多西环素对碱烧伤大鼠角膜组织中 IL-1 和 TNF- α 表达的影响 [J]. *眼科新进展*, 2014, 34(10): 915–917.
- FU X Y, ZOU W J, YU Q, et al. Effects of doxycycline on IL-1 and TNF- α in rat alkali burn corneas [J]. *Recent Adv Ophthalmol*, 2014, 34(10): 915–917.
- [12] 徐小芹. 角膜碱烧伤大鼠接受多西环素干预后的细胞凋亡情况及角膜和房水中 IL-1、TNF- α 、HIF-1 α 的表达 [J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(17): 2313–2315, 2319.
- XU X Q. Effect of doxycycline intervention on the apoptosis as well as the IL-1, TNF- α and HIF-1 α expression in cornea and aqueous humor in rats with corneal alkali burn [J]. *J Hainan Med Univ*, 2017, 23(17): 2313–2315, 2319.
- [13] 张雷, 李康, 武斌. 米诺环素对大鼠角膜碱烧伤炎症反应调控的机制研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(21): 2256–2259.
- ZHANG L, LI K, WU B. Regulation mechanism of minocycline on inflammatory reactions of rats corneal alkali burn [J]. *J Clin Exp Med*, 2019, 18(21): 2256–2259.
- [14] YU F S, YIN J, XU K, et al. Growth factors and corneal epithelial wound healing [J]. *Brain Res Bull*, 2010, 81(2/3): 229–235.
- [15] LJUBIMOV A V, SAGHIZADEH M. Progress in corneal wound healing [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 49: 17–45.
- [16] 王晓杰, 惠琦, 金子, 等. 生长因子在眼的发育及眼部疾病调控中的作用 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2022, 51(5): 613–625.
- WANG X J, HUI Q, JIN Z, et al. Roles of growth factors in eye development and ophthalmic diseases [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2022, 51(5): 613–625.
- [17] SUGIMOTO M, TSUKITOME H, OKAMOTO F, et al. Clinical preferences and trends of anti-vascular endothelial growth factor treatments for diabetic macular edema in Japan [J]. *J Diabetes Investig*, 2019, 10(2): 475–483.
- [18] 王利然, 杨丽红, 宁文华, 等. 长链非编码 RNA 调控血管新生的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 143–149.
- WANG L R, YANG L H, NING W H, et al. Research progress of long non-coding RNA involvement in angiogenesis [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(4): 143–149.
- [19] 李维纳, 林超群, 阳昇, 等. 阿柏西普对小鼠角膜碱烧伤后新生血管的抑制效果及机制探讨 [J]. *现代医药卫生*, 2022, 38(1): 35–39.
- LI W N, LIN C Q, YANG S, et al. The inhibitory effect and mechanism of Aflibercept on corneal neovascularization after alkali burn in mice [J]. *J Mod Med Health*, 2022, 38(1): 35–39.
- [20] ZHANG Q Y, TAO S Y, LU C, et al. Osthole: a traditional Chinese medicine for ocular anti-angiogenic therapy [J]. *Ophthalmic Res*, 2020, 63(5): 483–490.
- [21] 宋东宇, 高明宏, 李冬梅. 人脐带间充质干细胞移植治疗角膜碱烧伤的实验研究 [J]. *国际眼科杂志*, 2023, 23(5): 717–722.
- SONG D Y, GAO M H, LI D M. Experimental study of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of alkali-burned cornea [J]. *Int Eye Sci*, 2023, 23(5): 717–722.
- [22] 王培红, 李凌茵, 周莹莹, 等. 甘草甜素对小鼠角膜急性碱烧伤后新生血管的抑制作用 [J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20(12): 2034–2038.
- WANG P H, LI L H, ZHOU Y Y, et al. Inhibition of Glycyrrhizin on acute alkali burn induced corneal neovascularization in mice [J]. *Int Eye Sci*, 2020, 20(12): 2034–2038.
- [23] 邹志康, 吴共发, 邱丽波, 等. 吡非尼酮抑制大鼠角膜急性碱烧伤后新生血管的实验研究 [J]. *中华眼科医学杂志(电子版)*, 2018, 8(5): 216–222.
- ZOU Z K, WU G F, QIU L Z, et al. The study of the inhibiting effect of pirfenidone on rat corneal neovascularization by acute alkali burn [J]. *Chin J Ophthalmol Med Electron Ed*, 2018, 8(5): 216–222.
- [24] 张慧, 单伟. 阿柏西普对碱烧伤大鼠角膜新生血管的抑制作用 [J]. *眼科新进展*, 2020, 40(2): 120–124.
- ZHANG H, SHAN W. Inhibitory effect of Aflibercept on corneal neovascularization in rats with alkali burns [J]. *Recent Adv Ophthalmol*, 2020, 40(2): 120–124.
- [25] CHEN Y, ZHAO T, HAN M, et al. Gigantol protects retinal pigment epithelial cells against high glucose-induced apoptosis, oxidative stress and inflammation by inhibiting MTDH-mediated NF- κ B signaling pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2024, 46(1): 33–39.
- [26] YU Z, ZHANG T, GONG C, et al. Erianin inhibits high

- glucose-induced retinal angiogenesis via blocking ERK1/2-regulated HIF-1 α -VEGF/VEGFR2 signaling pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6: 34306.
- [27] AVERY R L, CASTELLARIN A A, STEINLE N C, et al. Systemic pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravitreal aflibercept, bevacizumab, and ranibizumab [J]. Retina, 2017, 37(10): 1847-1858.
- [28] PAPADOPOULOS Z. Aflibercept: a review of its effect on the treatment of exudative age-related macular degeneration [J]. Eur J Ophthalmol, 2019, 29(4): 368-378.
- [29] 张国明, 田娅. 阿柏西普在眼科疾病治疗中的应用 [J]. 眼科新进展, 2020, 40(1): 1-5.
- ZHANG G M, TIAN Y. Advances in application of Aflibercept for treatment of ocular diseases [J]. Recent Adv Ophthalmol, 2020, 40(1): 1-5.
- [30] 蒋波, 李涛, 王智, 等. 眼部化学灼伤 36 例治疗分析 [J]. 中国实用眼科杂志, 2016, 34(12): 1317-1319.
- JIANG B, LI T, WANG Z, et al. Analysis of treatment effect on 36 cases with ocular chemical injuries [J]. Chin J Pract Ophthalmol, 2016, 34(12): 1317-1319.
- [31] 蒋波, 李涛, 余曼, 等. 眼碱烧伤后干眼表现及转化生长因子- β 表达的研究 [J]. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2019, 41(11): 801-807.
- JIANG B, LI T, SHE M, et al. Study of manifestations of dry eye and TGF- β expression after ocular alkali burn [J]. Chin J Ocul Trauma Occup Eye Dis, 2019, 41(11): 801-807.
- [收稿日期] 2023-11-30

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!