

羊膜匀浆提取液抑制兔角膜新生血管及超微结构的研究

叶芬, 蒋峰, 施宇华, 黄振平

基金项目: 中国南京军区南京总医院科研基金资助项目 (No. 2010Q025)

作者单位: (210002) 中国江苏省南京市, 南京大学临床学院-南京军区南京总医院眼科

作者简介: 叶芬, 硕士, 住院医师, 研究方向: 角膜病、白内障。

通讯作者: 黄振平, 博士, 主任医师, 主任, 研究方向: 白内障、角膜病。hzp19633@hotmail.com

收稿日期: 2013-03-15 修回日期: 2013-05-24

Amniotic membrane suspension on diminishing corneal neovascularization and ultrastructure induced by alkali burn in rats

Fen Ye, Feng Jiang, Yu-Hua Shi, Zhen-Ping Huang

Foundation item: Scientific Research Fund of Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, China (No. 2010Q025)

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Nanjing University / Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhen-Ping Huang. Department of Ophthalmology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. hzp19633@hotmail.com
Received: 2013-03-15 Accepted: 2013-05-24

Abstract

• **AIM:** To study the effect of amniotic membrane (AM) suspension on corneal neovascularization (CNV) and ultrastructure in corneal alkali burn, and to explore the best concentration of AM for the clinical treatment.

• **METHODS:** Forty eyes from 40 Sprague-Dawley male rats were used. After alkali injuries at central corneal using 1mol/L NaOH, the control group (Group A) received topical PBS four times a day. The rest groups (Group B, C, D) received topical AM suspension with different concentration (240, 400, 560 μ g/mL). Using slit lamp biomicroscopy, CNV were evaluated and scored. Tissue ultrastructure changes of cornea were analyzed by corneal confocal microscope.

• **RESULTS:** The area of CNV were statistically different at each time point between group C and group A, B (all $P < 0.05$). CNV were reduced as AM concentrations increased, while there were no significant differences between group C and group D. Inflammatory cells in corneal were reduced in group AM-treated groups.

• **CONCLUSION:** AM suspension leads to significant reduce in CNV with increasing AM concentrations. However, when the concentration reached 400 μ g/mL, the effects on restraining CNV cannot be enhanced by

concentration. This effect may be elicited in part through the inhibiting of inflammatory cells.

• **KEYWORDS:** alkali burn; amniotic membrane suspension; corneal neovascularization

Citation: Ye F, Jiang F, Shi YH, et al. Amniotic membrane suspension on diminishing corneal neovascularization and ultrastructure induced by alkali burn in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(8):1529-1532

摘要

目的: 观察羊膜匀浆提取液对大鼠碱烧伤后抑制角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 以及对角膜超微结构的影响, 探讨羊膜匀浆提取液 (amniotic membrane, AM) 临床应用的合理浓度。

方法: SD 大鼠 40 只 40 眼, 通过 1mol/L 的 NaOH 建立角膜碱烧伤模型。对照组 (A 组) 行 PBS 液点眼 4 次/d, 其余三组 (B、C、D 组) 分别行 240, 400, 560 μ g/mL 的 AM 点眼。通过裂隙灯显微镜记录并比较四组角膜新生血管的生长情况。角膜共聚焦显微镜动态观察损伤后角膜的超微结构。

结果: 损伤后的各个时间点, C 组的角膜新生血管面积与 A、B 两组均有显著性差异 ($P < 0.05$), 即随着羊膜匀浆提取液浓度的增加, 其抑制角膜新生血管的作用增强。但是 C、D 两组之间的 CNV 面积差异无统计学意义。角膜共聚焦显微镜观察发现, 羊膜匀浆提取液治疗组的多形核细胞浸润明显少于对照组。

结论: 羊膜匀浆提取液对碱烧伤后角膜新生血管的抑制作用呈剂量依赖性, 但当浓度达到 400 μ g/mL, 其对角膜新生血管的抑制作用趋于稳定。这可能部分与羊膜匀浆提取液抑制碱烧伤炎症反应有关。

关键词: 碱烧伤; 羊膜匀浆提取液; 角膜新生血管

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.08.04

引用: 叶芬, 蒋峰, 施宇华, 等. 羊膜匀浆提取液抑制兔角膜新生血管及超微结构的研究. *国际眼科杂志* 2013;13(8):1529-1532

0 引言

眼表化学性烧伤和热烧伤是眼科常见急症, 在烧伤恢复过程中, 由于角膜新生血管的形成导致角膜透明性破坏, 影响患者视力甚至导致角膜盲。目前研究发现, 羊膜中含有大量的血管抑制因子, 将新鲜羊膜制备成匀浆提取液可以促进角膜上皮愈合, 抑制炎症反应, 抑制角膜新生血管和角膜瘢痕形成^[1-3]。但是羊膜匀浆提取液临床应用的合理浓度以及其抑制角膜新生血管形成的作用机制尚未达成共识。本文比较不同浓度的羊膜匀浆提取液浓度对大鼠角膜新生血管的影响, 并通过角膜共聚焦显微镜活体动态观察使用羊膜匀浆提取液后角膜的超微结构变

化,探讨羊膜匀浆提取液临床应用的合理浓度,以及其抑制角膜新生血管的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠角膜碱烧伤模型的制作:SD大鼠40只(南京军区南京总医院比较医学科提供),体质量180~200g,清洁级,雌雄不限。用100g/L水合氯醛+安定腹腔注射(0.3mL/100g)麻醉大鼠后,在裂隙灯显微镜下检查见大鼠角膜透明。随机分为A、B、C、D四组($n=10$),均建立右眼角膜碱烧伤模型。

1.2 方法 用4g/L奥布卡因滴眼液滴眼2次,行表面麻醉,将直径为3mm圆形滤纸片浸入1mol/L氢氧化钠溶液20s,取出后用滤纸吸去过多碱液,将其贴敷于右角膜中央40s。立即用生理盐水冲洗烧伤区及结膜囊直至pH=7,涂红霉素及10g/kg硫酸阿托品眼膏预防感染及扩瞳预防虹膜后粘连。损伤后A组行PBS点眼,4次/d;B组行240 μ g/mL羊膜匀浆提取液(amniotic membrane, AM)点眼,C组行400 μ g/mL AM点眼,D组行560 μ g/mL AM点眼。AM的制备:新鲜羊膜来源于我院产科健康剖宫产孕妇,血液学检查排除艾滋病、乙肝、丙肝、梅毒等传染性疾病。用50 μ g/mL青霉素,50 μ g/mL庆大霉素和2.5 μ g/mL两性霉素B的生理盐水将羊膜冲洗3遍,通过羊膜与绒毛膜剩余部分两层组织之间的潜在腔隙进行钝性分离获取羊膜。将羊膜上皮面向上贴附于手术贴膜上,剪成5cm \times 5cm大小。各步骤均严格遵守无菌原则,避免污染。在无菌工作台上,在PBS液中清洗3次,称取羊膜的湿重,置入10mL离心管中,按1:1加入PBS液,放入匀浆机中(5000r/min,30s),匀浆后按1:5加入无菌PBS液,于离心机中离心(2000r/min 10min),取上清液(2h内使用)。羊膜匀浆提取液蛋白含量测定:采用Folin-酚法,先制作标准曲线和方程式,再测定羊膜匀浆提取液的光密度值,根据标准曲线得到的方程式计算蛋白含量。连续测定三次,取平均值作为最终测量浓度。根据标准曲线和方程式计算羊膜匀浆提取液蛋白含量为800 μ g/mL。

1.2.1 裂隙灯显微镜观察角膜新生血管的生长情况 碱烧伤后每日行裂隙灯显微镜观察,前节照相,观察并记录角膜的透明度及混浊情况。碱烧伤后3,14,28d行裂隙灯显微镜观察并记录角膜新生血管形成情况,计算新生血管面积。一旦发现角膜缘内有角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)增生,每次均测量自角膜缘长出的CNV长度,通过量角规测量连续弯曲度小、朝向角膜混浊中心生长的最长血管。记录其累计角膜的圆周钟点数。按Robert公式计算新生血管面积 $S=c/12 \times 3.1416 \times [r^2 - (r-l)^2]$ 。其中c为CNV累及角膜的圆周钟点数,l为CNV从角膜缘深入角膜的长度,r为SD大鼠角膜半径。

1.2.2 角膜共聚焦显微镜观察损伤后角膜超微结构变化 角膜共聚焦显微镜由海德堡视网膜激光断层扫描系统II代和Rostock角膜模块组件组成(德国海德堡公司)。受检眼用4g/L倍诺喜滴眼液表面麻醉2次后用开睑器开睑,滴用Vidisc眼凝胶(美国博士伦公司),调整操纵台高度和CCD摄像头位置,滴1滴Vidisc眼凝胶于物镜头表面,盖上一次性无菌的角膜接触帽。固定鼠眼于物镜上,进行检查。

统计学分析:采用SPSS 18.0统计学软件进行统计分析。主要分析指标为角膜新生血管的面积,所有数据以

($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用SNK-q检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯显微镜观察 角膜碱烧伤后,四组均出现角膜水肿,角膜上皮缺失。A组新生血管粗乱,密集成堆,不易分辨,新生血管生长快且范围广,迅速覆盖整个角膜缘,形成环状和袢状温网;碱烧伤后11d可见大量密集粗乱的新生血管长入角膜,此时新生血管面积最大,几乎分布整个透明角膜区(图1A),随后新生血管生长速度明显减慢;B组碱烧伤后8d新生血管面积达到最大,新生血管分布未及整个透明角膜区,新生血管管腔较大,分布较A组明显局限且稀疏(图1B)。C组新生血管短,小,管径较细,碱烧伤后第9d新生血管面积最大,分布稀疏而且细小(图1C)。D组角膜新生血管细小,分布相当局限,与C组无明显区别(图1D)。

各组CNV出现时间的比较兔角膜碱烧伤后裂隙灯显微镜观察,A组CNV出现的时间为 3.1 ± 0.5 d,明显早于B组(4.5 ± 0.4 d),C组(5.2 ± 0.6 d),D组(4.9 ± 0.5 d)。A组与其余3组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),B组与C、D组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);而C组与D组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

碱烧伤后3,11,28d各组角膜新生血管面积的比较:碱烧伤后3,11,28d,A组与B、C、D组CNV面积之间有显著性差异,B组与C、D两组之间差异有统计学意义,说明羊膜匀浆提取液可以显著抑制碱烧伤后角膜新生血管的形成。但C组与D组之间差异均无统计学意义。从而推测当羊膜匀浆提取液浓度到达400 μ g/mL时,其抑制角膜新生血管形成的作用趋于稳定(表1,图2)。

2.2 角膜共聚焦显微镜观察 碱烧伤后第3d,A组近角膜缘处的角膜浅基质层角膜新生血管,烧伤后第11d角膜新生血管密度达到最大,可见大量密集的角膜新生血管,管腔粗大并交织成网状,管壁界限清晰,动态连续扫描模式可见血管内血细胞流动(图3A);B组于碱烧伤后第4d出现角膜新生血管,角膜新生血管数目较对照组明显减少,管腔较大,交织成袢状(图3B);C组和D组角膜新生血管分布稀疏,管腔细小(图3C)。

碱烧伤后第3d左右,各组角膜内皮细胞边界模糊,细胞间连接疏松。浅基质层细胞间隙暗区扩大,可见细小点状炎性细胞浸润。烧伤后第15d,炎性细胞浸润至深基质层;烧伤后第20d,炎性细胞减少,多沿纤维走行分布。A组的炎性细胞反应最强烈,可见大量多形核细胞浸润(图4A)。B组高密度反光点明显减少(图4B),但C组和D组之间没有明显的差异(图4C,D)。

3 讨论

角膜的透明性是角膜维持正常生理功能,形成良好视觉质量的基础条件。当化学烧伤发生后,角膜缘的物理屏障破坏,导致角膜基质板层胶原的紧密排列发生紊乱,促血管生成因子和血管抑制因子之间的平衡状态被打破,导致角膜血管化开关开启,角膜缘血管侵入角膜中央,形成角膜新生血管^[4,5]。新生血管的形成为可促进角膜创面的修复,但是破坏的角膜的透明性被破坏,影响视力。因此抑制碱烧伤后角膜新生血管的形成,对维持角膜的透明性有着重要的临床意义。

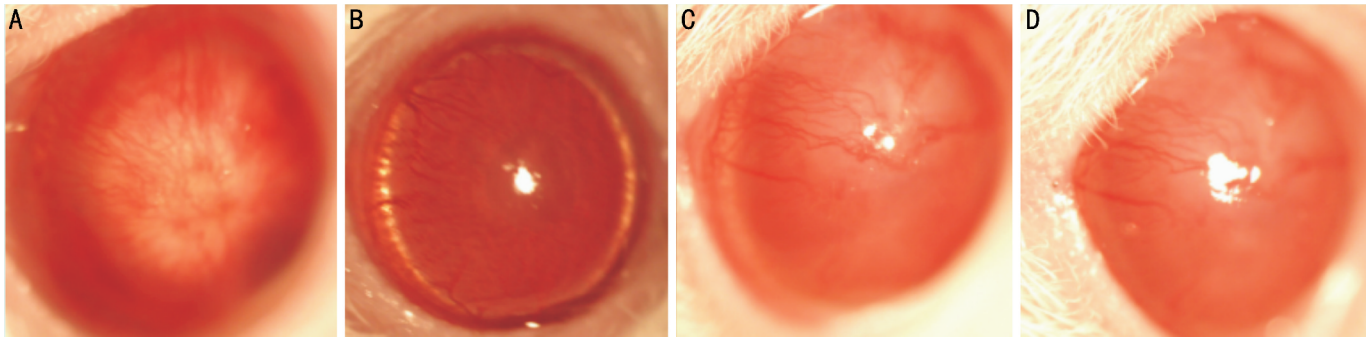


图1 碱烧伤后行裂隙灯显微镜观察 A:第11d,A组可见大量密集粗乱的新生血管长入角膜,此时新生血管面积最大,几乎分布整个透明角膜区;B:第8d,B组新生血管面积达到最大,新生血管分布未及整个透明角膜区,新生血管管腔较大,分布局限且稀疏;C:第9d,C组新生面积达到最大,血管短,小,管径较细,分布稀疏而且细小。D:第9d,D组角膜新生血管达到最大,管径细小,分布相对局限。

表1 碱烧伤后第3,11,28d 各组角膜新生血管面积的比较

组别	第3d	第11d	第28d
A组	19.26±1.48	48.72±2.12	35.21±1.19
B组	17.32±0.61	38.32±1.89	28.17±1.21
C组	14.83±0.34	35.12±1.77	25.42±0.79
D组	15.03±0.79	34.79±1.63	25.01±0.92

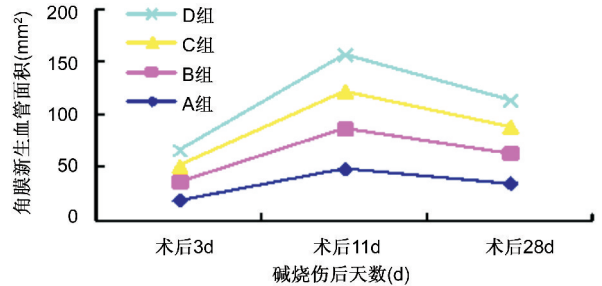


图2 碱烧伤后3,11,28d 各组角膜新生血管面积的比较。

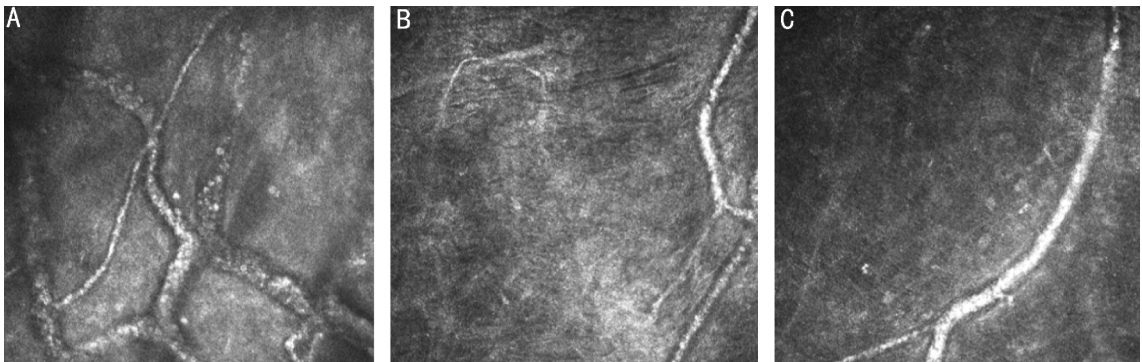


图3 碱烧伤后角膜共聚焦显微镜观察 A:第11d,A组角膜新生血管密度达到最大,可见大量密集的角膜新生血管,管腔粗大并交织成网状,管壁界限清晰,动态连续扫描模式可见血管内血细胞流动;B:第10d,B组角膜新生血管数目较对照组明显减少,管腔较大,交织成祥状;C:第10d,C组和D组角膜新生血管分布稀疏,管腔细小。

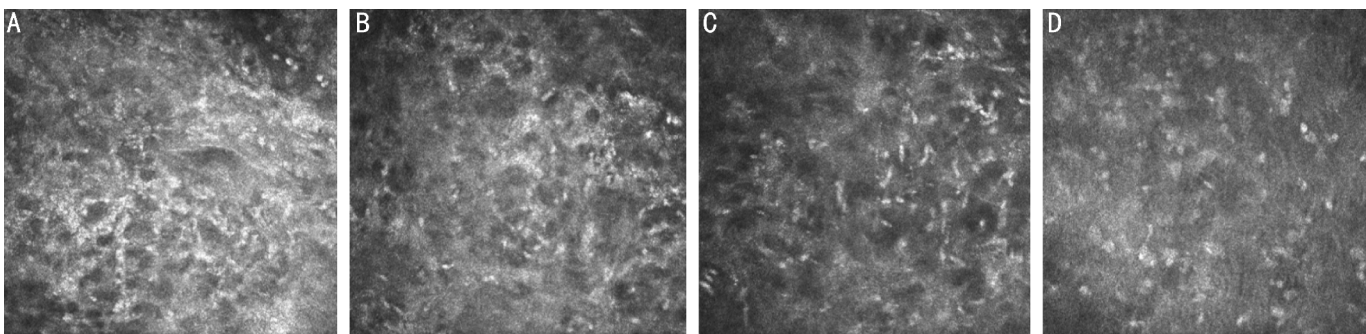


图4 碱烧伤后角膜共聚焦显微镜观察 A:第7d,A组炎症细胞反应最强烈,可见大量多形核细胞浸润;B:第7d,B、C两组高密度反光点较A组明显减少;图C、D:第6d,C组和D组炎症反应最强烈,但是浸润的炎症细胞明显小于A组和B组。

研究发现,羊膜匀浆提取液可以抑制角膜新生血管形成。本文使用羊膜匀浆提取液,发现其可以显著降低碱烧伤后大鼠角膜新生血管的形成,与之前的研究结果相一致。本文将羊膜匀浆提取液的浓度设定为0,240 $\mu\text{g}/\text{mL}$,400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以及560 $\mu\text{g}/\text{mL}$,是因为韩玉萍等^[6]研究比较

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的羊膜匀浆上清液对兔角膜新生血管的抑制作用,发现羊膜匀浆上清液有减轻角膜血管化作用,并呈浓度依赖性,但是对大于400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的羊膜匀浆提取液对角膜新生血管的作用没有研究。因此本文将羊膜匀浆提取液浓度设定为0,240 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,560 $\mu\text{g}/\text{mL}$,研究发现术后3,11,28d,随着羊膜匀浆提取液浓度的增加,角膜新生血管面积显著降低,但是400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的角膜新生血管面积之间没有显著性差异,既当羊膜匀浆提取液浓度到达400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其对角膜新生血管的抑制作用达到最大。而且本文在传统的比较角膜新生血管面积外,还通过共聚焦显微镜活体动态观察角膜新生血管的生长情况,发现使用羊膜匀浆提取液后,大鼠的角膜新生血管管径较细,分布局限。更加客观的证实了羊膜匀浆提取液对角膜新生血管的抑制作用。

目前对羊膜匀浆提取液抑制角膜新生血管的具体作用机制尚不明确。但是普遍认为与羊膜匀浆提取液中所含的大量生长因子和细胞因子有关^[7-9]。本文通过共聚焦显微镜动态观察碱烧伤后角膜超微结构的改变,发现使用羊膜匀浆提取液后,角膜基质层的炎症反应较对照组明显减轻,多形核细胞数量明显较少。从而推测羊膜匀浆提取液抑制角膜新生血管,可能部分与其减轻角膜损伤区域的炎症反应有关。而之所以能减轻炎症反应,可能与羊膜匀浆提取液中含有的多种细胞因子有关^[10,11]。除此之外,羊膜匀浆提取液中所含的可溶性的抗新生血管细胞因子,如色素上皮衍生因子、内皮抑素、血管抑素、血小板反应蛋白1和血小板因子4等^[12,13],也可以调节促新生血管细胞因子和抗新生血管细胞因子之间的平衡状态,抑制角膜新生血管的形成^[14,15]。因此随着羊膜匀浆提取液浓度的增加,所含的细胞因子和生长因子的增多,其对碱烧伤后角膜新生血管的抑制作用增强。但是当羊膜匀浆提取液的浓度到达400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,角膜新生血管的数量、面积不再减少,对角膜新生血管的抑制作用不再成剂量依赖性增加,而是趋于稳定。这可能与抑制作用的饱和性有关。然而其确切的作用机制有待进一步更加深入的研究。

综上所述,羊膜匀浆提取液是一种特殊的生物学材料,具有免疫性低,促进角膜上皮修复、抗炎、抗新生血管及抗纤维化等特性。但是其在临床应用的剂量及疗效需要进一步更大样本,更长期的基础和临床研究;同时需要进一步分析羊膜匀浆提取液中的蛋白成分,对其抑制角膜新生血管的作用机制进行更加细致的研究。

参考文献

1 Gicquel JJ, Bejjani RA, Ellies P, et al. Amniotic membrane transplantation in severe bacterial keratitis. *Cornea* 2007;26(1):27-33

2 Alessandra R, Paola B, Paolo B. The effects of different preservation processes on the total protein and growth factor content in a new biological product developed from human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank* 2012;13(2):353-361

3 Shahriari HA, Mohammad FT. Comparison of the Effect of Amniotic Membrane Suspension and Autologous Serum on Alkaline Corneal Epithelial Wound Healing in the Rabbit Model. *Cornea* 2008;27(10):1148-1150

4 David E, Azar DT, Hallak JA, et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Progress in Retinal and Eye Research* 2010;29(3):208-248

5 Onguchi T, Han KY, Chang JH, et al. Membrane type-1 matrix metalloproteinase potentiates basic fibroblast growth factor-induced corneal neovascularization. *Am J Pathol* 2009;174(4):1564-1571

6 韩玉萍,李冰,王丽洁.人羊膜匀浆上清液抑制兔角膜新生血管的研究. *眼科研究* 2009;27(1):15-18

7 Choi JA, Jin HJ, Jung A, et al. Effects of amniotic membrane suspension in human corneal wound healing *in vitro*. *Molecular Vision* 2009;15(5):2230-2238

8 Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14(5):473-484

9 Rauz S, Saw VP. Serum eye drops, amniotic membrane and limbal epithelial stem cells-tools in the treatment of ocular surface disease. *Cell Tissue Bank* 2010;11(1):13-27

10 Tseng SC, Espana EM, Kawakita T, et al. How does amniotic membrane work? *Ocul Surf* 2004; 2(3):177-187

11 李琦,席兴华,张艳彬.人羊膜匀浆提取液抑制大鼠角膜碱烧伤后新生血管生成. *国际眼科杂志* 2007;7(5):1274-1277

12 Wichayacoop T, Briksawan P, Tuntivanich P, et al. Anti-inflammatory effects of topical supernatant from human amniotic membrane cell culture on canine deep corneal ulcer after human amniotic membrane transplantation. *Vet Ophthalmol* 2009;12(1):28-35

13 Takahashi H, Igarashi T, Fujimoto C, et al. Immunohistochemical observation of amniotic membrane patching on a corneal alkali burn *in vivo*. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51(1):3-9

14 廖琼,刘翔.羊膜匀浆上清液对兔角膜上皮细胞增殖的影响. *眼科新进展* 2004;24(4):264-265

15 Jo N, Mailhos C, Ju M, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Am J Pathol* 2006;168(6):2036-2053