

恒温下兔角膜热烧伤后继发新生血管建模初步研究

贾雍, 蒋华, 王永强

作者单位: (250031) 中国山东省济南市, 第二军医大学济南军区总医院眼科

作者简介: 贾雍, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 角膜病与角膜移植。

通讯作者: 蒋华, 主任医师, 眼科主任, 研究方向: 角膜病与角膜移植. jianghua108@126.com

收稿日期: 2014-03-24 修回日期: 2014-06-06

Preliminary study of rabbit model with corneal neovascularization after thermal burn under the constant temperature

Yong Jia, Hua Jiang, Yong-Qiang Wang

Department of Ophthalmology, Jinan Military General Hospital, the Second Military Medical University, Jinan 250031, Shandong Province, China

Correspondence to: Hua Jiang. Department of Ophthalmology, Jinan Military General Hospital, the Second Military Medical University, Jinan 250031, Shandong Province, China. jianghua108@126.com

Received: 2014-03-24 Accepted: 2014-06-06

Abstract

• **AIM:** To explore the suitable conditions in rapid model of corneal neovascularization (CNV) after thermal burn under different constant temperature in rabbit.

• **METHODS:** Total 45 New Zealand white rabbits were divided randomly into five groups (A, B, C, D, E). A groups: 100°C ($n = 10$), B groups: 200°C ($n = 10$), C groups: 300°C ($n = 10$), D groups: 400°C ($n = 10$), and E groups: control group ($n = 5$). All left eyes of rabbits in A, B, C, D groups were induced corneal neovascularization by constant temperature burning device. The growth of CNV was observed by slit lamp microscope and the area of CNV were recorded on 4th, 7th, 14th, 30th days postoperatively. SPSS 19.0 statistical package was used for data analysis, and the data was recorded by mean \pm standard deviation. Comparison by analysis of variance was made by repeated measures in the area of neovascularization at each time point in groups. Statistical tests were considered significantly when P values were less than 0.05.

• **RESULTS:** On postoperative 4th, 7th, 14th, 30th days; no neovascularization was found after corneal thermal burn in A group, but only a few nebula left ($n = 2$); the area of CNV were (9.16 \pm 1.45) mm², (37.73 \pm 5.49) mm², (62.44 \pm 7.54) mm², (40.28 \pm 7.39) mm² in B group respectively; and (11.45 \pm 1.04) mm², (44.51 \pm 4.64) mm², (66.13 \pm 4.13) mm², (43.04 \pm 2.33) mm² in C group respectively; and (13.23 \pm

0.86) mm², (47.26 \pm 4.59) mm², (67.57 \pm 4.56) mm², (45.59 \pm 4.44) mm² in D group respectively, and part corneal carbide ($n = 4$) was observed as well as corneal perforation ($n = 6$) were found on 3d in D group. No neovascularization was found in normal control group. Comparison of the areas of CNV at each time point between groups was statistically different, $P < 0.05$. Statistical differences were found among B, C, D groups, $P < 0.05$.

• **CONCLUSION:** In 4 to 7d, the higher the temperature is, the more the neovascularization area of CNV are. It has no significant difference in 14 to 30d. But corneal carbide and corneal perforation are often found in 400°C group, so its modeling failure rate is high. It is between 200°C and 300°C that repeatability and uniformity of the corneal neovascularization model of rabbit are superior.

• **KEYWORDS:** corneal neovascularization; thermal burn; modeling

Citation: Jia Y, Jiang H, Wang YQ. Preliminary study of rabbit model with corneal neovascularization after thermal burn under the constant temperature. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(7): 1193-1196

摘要

目的: 初步研究恒温条件下兔角膜热烧伤后继发的角膜新生血管(CNV)快速制模的合适条件。

方法: 新西兰大白兔 45 只, 随机分为(A, B, C, D, E) 五组恒温烧灼器诱导实验性 CNV 模型, 除 E 组为 5 只, 其他组均为 10 只。A 组: 100°C, B 组: 200°C, C 组: 300°C, D 组: 400°C, E 组: 空白对照。以左眼为实验眼, 比较建模后第 4, 7, 14, 30d 在裂隙灯显微镜下观察各组角膜新生血管的生长情况并计算角膜新生血管生长面积。采用 SPSS 19.0 统计软件包对数据进行分析, 计算资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各时间点各自新生血管面积的比较采用重复测量数据的方差分析; 显著性标准为 $\alpha = 0.05$ 。

结果: 制模后第 4, 7, 14, 30d, A 组角膜热烧伤后无明显新生血管生长, 仅少量留有角膜云翳 ($n = 2$)。B 组新生血管面积分别为: 9.16 \pm 1.45, 37.73 \pm 5.49, 62.44 \pm 7.54, 40.28 \pm 7.39 mm²; C 组新生血管面积分别为: 11.45 \pm 1.04, 44.51 \pm 4.64, 66.13 \pm 4.13, 43.04 \pm 2.33 mm²; D 组新生血管面积分别为: 13.23 \pm 0.86, 47.26 \pm 4.59, 67.57 \pm 4.56, 45.59 \pm 4.44 mm²; D 组部分角膜局部出现焦化 ($n = 4$), 3d 内出现穿孔 ($n = 6$)。E 组未见新生血管生长。各时间点的 CNV 面积比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$), B, C, D 分组之间有统计学差异 ($P < 0.05$)。

结论: 角膜热烧伤 4 ~ 7d 时, 制模温度越高, 新生血管生长越快, 面积越大; 14 ~ 30d 新生血管面积无明显差别, 但 400°C 角膜制模失败率高, 200°C ~ 300°C 制作的兔角膜新

生血管模型均一性及重复性高。

关键词:角膜新生血管;热烧伤;建模

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.07.04

引用:贾雍,蒋华,王永强.恒温下兔角膜热烧伤后继发新生血管建模初步研究.国际眼科杂志 2014;14(7):1193-1196

0 引言

角膜热烧伤是临床常见的角膜病,据国外文献报道,在职业性工作事故造成的眼外伤中,角膜热烧伤和紫外线灼伤发病率约为11%^[1]。在其发生发展过程中,角膜新生血管(CNV)起着重要作用,常导致严重的视力下降甚至失明^[2]。因此,研究和探讨角膜热烧伤后新生血管的发病机制及消退过程中的关键因素非常重要,可以为临床工作中对角膜热烧伤有效地用药物或手术治疗提供理论依据。但目前国内外关于角膜热烧伤后继发新生血管的实验动物模型的研究报道相对较少,限制了角膜热烧伤后新生血管的基础研究^[3]。本研究通过恒温条件下不同温度制备角膜热烧伤后新生血管模型,初步探讨角膜新生血管模型快速制作的最好条件,以期对角膜热烧伤后继续新生血管机制研究及治疗提供实验基础和帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新西兰大白兔45只(雌雄兼有),8~12周龄,体质量1600~2200g,由济南军区总医院实验动物中心提供。饲养条件:温度24℃~26℃,湿度60%,明暗各12h。实验前双眼前节和眼底检查均正常。适应性喂养1wk开始实验。实验过程中对动物处置方法符合动物伦理学要求。

1.1.2 主要仪器 恒温烧灼器(烧灼探头自制,图1)广州黄花电子工具有限公司;BX900裂隙灯(瑞士HAAG-STREIT公司);动物手术显微镜(苏州医疗器械厂)。

1.1.3 主要药物 盐酸氯胺酮注射液(福建古田药业有限公司),盐酸赛拉嗪注射液(吉林省华牧动物保健品有限公司),盐酸奥布卡因滴眼液(参天制药株式会社),妥布霉素滴眼液[爱尔康(中国)眼科产品有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将45只兔随机分五组(A,B,C,D,E)。A组:100℃组(10只),B组:200℃组(10只),C组:300℃组(10只),D组:400℃组(10只),E组:空白对照组(5只)。

1.2.2 动物模型 恒温烧灼器按各组所需温度先设置好温度,接通电源,待指示灯显示达到预定温度后再行进一步操作。兔后肢肌肉注射氯胺酮注射液0.2mL+盐酸赛拉嗪注射液0.2mL麻醉,左眼盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉。麻醉成功后在显微镜下操作,开睑器开睑,棉签擦拭角膜表面液体,保持角膜干燥,探头凹面贴紧角膜中央区域开始烧灼并同时计时,接触时间5s,达到设定时间后立即停止烧灼,生理盐水冲洗角膜。术后点妥布霉素滴眼液以防止感染。所有实验及操作均遵循ARVO原则(the statement of Animals Research in Vision and Ophthalmic)。研究者已获得实验动物许可证。

1.2.3 术后用药 所有分组均于术后1d开始用药,术眼滴妥布霉素滴眼液,2次/d,至术后14d。

1.2.4 手术前后新生血管长度的测量 裂隙灯下观察所有兔术后角膜新生血管的动态生长情况,第1wk每天观察一次,以后每周观察2次,并对实验眼在裂隙灯下数码相机拍照。分别于制模后第4,7,14,30d,角膜按水平、垂直两轴分为4个象限,用游标卡尺测量4个象限自角膜缘长出的新生血管的长度,每次测量以连续弯曲度小,与角膜缘切线垂直的新生血管为准,分别估算新生血管面积并求其和。新生血管面积依据Robert电脑公式计算: $S = \sum C / 12 \times 3.1416 \times [r^2 - (r-l)^2]$,其中C为新生血管所占的圆周钟点数,r为角膜半径,l为新生血管长度,实验数据由2名专业人员进行独立的双盲评估测量^[4]。

1.2.5 排除标准 制模后出现角膜组织碳化者;角膜穿孔者;角膜组织化脓、感染者;全周血管丛生者列为模型失败,不计入统计范围内,同时补充相应例数。

统计学分析:采用SPSS 19.0统计软件包对数据进行分析,计算资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各时间点各自新生血管面积的比较采用重复测量数据的方差分析;两两比较采用LSD法,显著性标准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

制模后第4d,B组可见角膜水肿,角膜缘血管扩张充血,明显从角膜缘伸向角膜中央生长的毛刷状新生小血管(图2A);第7d,B组新生血管生长旺盛,密度均匀、垂直于角膜缘向角膜中央延伸、角膜水肿继续加重(图2B);第14d新生血管粗大,分支密集并互相吻合形成袢状血管网(图2C);第30d后,新生血管充血明显减轻,部分回退,但袢状新生血管网仍覆盖部分角膜(图2D)。而C组CNV生长较B组迅速,4~7d时CNV的长度和范围均大于B组,且血管密度更密集;D组CNV较C组亦如此。但随时间推移(14~30d),B、C、D三组无明显差异。A组仅初期(4d)仅见轻度角膜水肿,无明显新生血管生长。统计学分析表明:时间因素和分组因素之间不存在交互效应(Roy的最大根法, $F = 2.683, P = 0.067$)。进一步分析单独效应,各时间点的CNV面积比较,差异有显著性($F = 1167.200, P = 0.000$),B、C、D分组之间有统计学差异($F = 8.167, P = 0.002$)。4d时,三组之间的面积比较有显著的统计学差异($F = 31.806, P = 0.000$),两两比较(LSD法),C组比B组CNV面积明显增加,差异有显著性($P = 0.000$),D组比C组CNV面积明显增加,差异有显著性($P = 0.002$);7d时,三组之间的面积比较有显著的统计学差异($F = 9.930, P = 0.001$),两两比较C组比B组CNV面积明显增加,差异有显著性($P = 0.005$),D组比C组CNV面积,差异无显著性($P = 0.221$);14d时,三组之间的面积比较无显著的统计学差异($F = 2.217, P = 0.128$),两两比较C组比B组CNV面积,差异无显著性($P = 0.154$),D组比C组CNV面积,差异无显著性($P = 0.571$);30d时,三组之间的面积比较有显著的统计学差异($F = 2.657, P = 0.088$),两两比较C组比B组CNV面积,差异无显著性($P = 0.241$),D组比C组CNV面积,差异无显著性($P = 0.279$);见表1,图3。

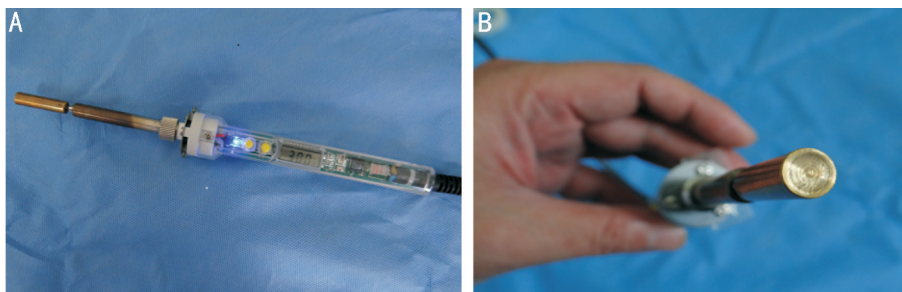


图1 恒温烧灼器 A:温控电烙铁;B:烧灼探头。

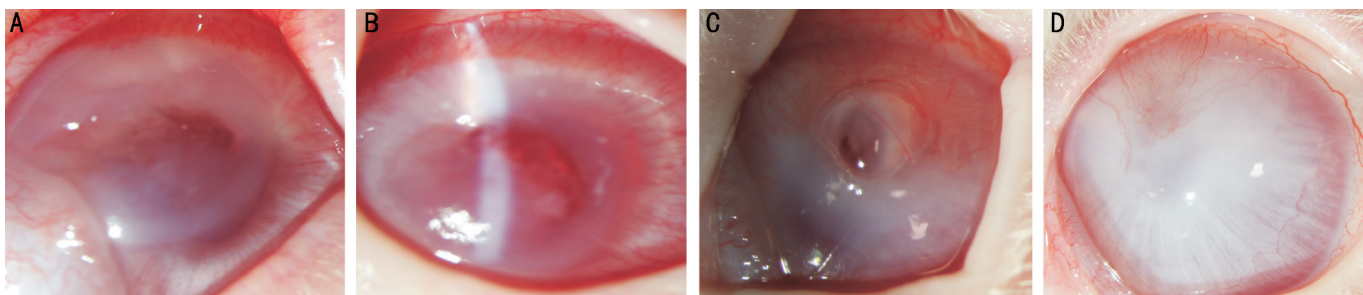


图2 B组角膜新生血管 A:术后4d; B:术后7d; C:术后14d; D:术后30d。

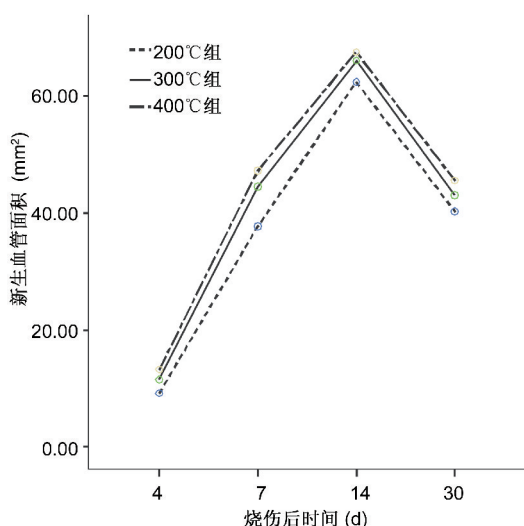


图3 新生血管交互效应轮廓图。

表1 B、C、D三组角膜热烧伤后不同时间继发角膜新生血管面积 (n=10, $\bar{x} \pm s$, mm²)

分组	术后4d	术后7d	术后14d	术后30d
B组	9.16±1.45	37.73±5.49	62.44±7.54	40.28±7.39
C组	11.45±1.04	44.51±4.64	66.13±4.12	43.04±2.33
D组	13.23±0.86	47.26±4.59	67.57±4.56	45.59±4.44
平均	11.28±2.02	43.17±6.26	65.38±5.85	42.97±5.44
F	31.806	9.930	2.217	2.657
P	0.000	0.001	0.128	0.088

注:主效应($F=1738.578, P=0.000$);交互效应($F=2.683, P=0.067$)。

3 讨论

角膜热烧伤多是由于角膜接触高温的固体、液体和气体所致。不论是在日常生活中还是在战时,角膜热烧伤都是常见的眼外伤^[5]。角膜热烧伤后可发生一系列的生理、病理、免疫等功能的改变,如胶原纤维溶解后穿孔,或修复时大量新生血管长入。其中角膜新生血管(CNV)是角膜炎症、外伤、感染、免疫排斥反应等多种疾病的共同病理变化,常使角膜失去透明性,导致严重的视力障碍^[6]。正常

的角膜组织内缺乏血管和淋巴,处于相对“免疫赦免区”。抗血管生成因素的存在和角膜基质形成的抗血管穿透性屏障,角膜的这些结构特点在一定程度上阻止了新生血管的形成。在外伤、炎症、免疫排斥反应或其他原因诱导时,维持角膜无血管的平衡因素被打破,最终导致了角膜新生血管的形成。目前研究发现,新生血管的发生与角膜缘解剖及功能异常、炎性反应、缺氧、多种血管生成因子增加、血管抑制因子减少、角膜水肿、角膜神经损伤等多种因素参与的多种过程有关。临床上CNV的治疗依然是世界性的难题之一,关键在于人们对于其确切的发病机制尚未明了。因此,CNV动物模型成功建立,是研究CNV调控机制、探索和评价其防治方法的重要手段。

理想的动物模型应该同人类具有相同或相似的临床表现和病理改变。同时理想的动物模型还应该具有成模率高、造模周期短、费用低、易于制作、便于观察等特点。目前制作角膜新生血管模型的实验动物主要为大鼠和兔。其眼球与人眼的主要区别在于角膜内皮具有很强的再生能力,角膜具有较强的自我修复能力^[7,8]。但大体上来说,大鼠和兔角膜与人类的解剖结构仍具有较高的相似度。选用兔作为实验对象,眼球体积大,双眼均可制作模型,易于操作及观察。

角膜新生血管动物模型属于诱发性疾病动物模型,它可以通过物理、化学、生物、手术等因素作用,人为诱发动物角膜新生血管生长,产生类似于人类疾病的模型^[9]。常用的制作方法主要包括:(1)物理方法诱导的CNV动物模型,此方法一般包括热烧灼术^[10]和角膜缝线法^[11,12]。(2)化学方法诱导的CNV动物模型,常用的化学药品有氢氧化钠^[13]等。(3)角膜囊袋鉴定法诱生的CNV模型。(4)免疫原性CNV动物模型。(5)其它方法制备的CNV的动物模型;角膜基质肿瘤组织植入术。

在制作角膜热烧伤后新生血管实验动物模型时,要求烧灼造成的角膜损伤程度具有较高的一致性和可重复性。而在影响角膜热烧伤程度的众多因素里,温度的控制较困难。目前有文献报道应用铁片酒精灯加热烧灼角膜,以及沸水滴眼制作大鼠或者兔角膜热烧伤模型^[14,15]。但影响

烧灼温度的因素较多,例如室内温度、湿度、泪液、操作熟练程度等都会造成烧灼温度的不稳定,影响模型制作的效果和一致性,造成模型制作的可重复性较差。赵敏等^[16]曾应用带半导体测温仪的自制烧灼器制作大鼠热烧伤模型,将温度变化控制在3℃之内,但目前国内关于恒温条件下制作兔角膜热烧伤后新生血管模型尚无报道。

本实验中,模型制作的原则是在能达到产生新生血管程度的前提下,尽量选用较低的烧灼温度,并尽量缩短烧灼时间,在两者之间寻找最佳的结合点,探讨角膜热烧伤后新生血管模型制作的最佳条件。在前期的预实验中,我们发现烧灼温度<100℃时,兔受伤角膜短期内就可恢复透明性,无明显新生血管生长。>400℃时,角膜组织短期内就会出现焦灼碳化;烧灼时间<3s时,操作中时间控制较困难,误差较大,>10s时,因角膜的热传导性较好,结膜及前房内正常结构也会受到影响。本实验通过恒温烧灼器制备角膜新生血管模型,温度可控并恒温,200℃~300℃,接触5s,制作的新生血管模型稳定,简单快捷,有利于观察和比较新生血管生长情况,可排除化学方法的化学药物对防治药物的影响,处理术后感染较其它方法容易;且可避免诸如化学试剂的影响及角膜囊带及肿瘤植入等所致血管生长方式不稳定、血管密度不均匀、甚至角膜全周血管丛生、角膜水肿糜烂程度严重或伴有过多的肿瘤组织增生等缺点。本实验术后观察到的诱生CNV呈向心性局限性生长,且伴有不同程度的炎症反应。该法操作相对简单,技术成熟,一致性及重复性好,利于对实验结果的定量分析,体现出恒温条件下兔角膜热烧伤后新生血管模型制作方法的优越性和科学性。

参考文献

- 1 Nicaeus T, Erb C, Rohrbach M, et al. An analysis of 148 outpatient treated occupational accidents. *Klin Monbl Augenheilkd* 1996;209(4):A7-11
- 2 陈家祺,赵敏.角膜移植治疗角膜重度热烧伤的临床研究. *中国实*

- 用眼科杂志 1997;15(9):524-528
- 3 Struck HG, Schrage NF. Chemical and thermal eye burns. Conservative and surgical options of a stage-dependent therapy. *Ophthalmologie* 2011;108(10):921-928
- 4 D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(9):4082-4085
- 5 周世有,陈家祺,夏小平.角膜热烧伤研究新进展. *国外医学眼科学分册* 1998;5(22):271-275
- 6 Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12(4):242-249
- 7 Sahori A. Long-term follow-up of wound healing following epikeratophakia in rabbits. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 1990;94(6):572-581
- 8 Shin JS, Jang IK, Kim CW, et al. Development and characterization of a rabbit corneal endothelial cell line. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48(5):454-459
- 9 邱培瑾,姚克.角膜新生血管的动物模型. *国外医学眼科学分册* 2002;24(6):360-363
- 10 Boncham GC, Collin HB. Steroid inhibition of limbal blood and lymphatic vascular cell growth. *Curr Eye Res* 1995;14(1):1-10
- 11 Dana MR, Zhu SN, Yamada J. Topical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularization. *Cornea* 1988;17(4):403-409
- 12 Zhu SN, Dana MR. Expression of cell adhesion molecules on limbal and neovascular endothelium in corneal inflammatory neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(7):1427-1434
- 13 Connors MS, Urbano F, Vafeas C, et al. Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(10):1963-1971
- 14 李雪,许锦堂,崔浩.兔眼碱、酸、热烧伤后蛋白抗原性变化的研究. *眼外伤职业眼病杂志* 2003;25:149-151
- 15 郑秋平,邱璐璐,宋秋颖.高浓度羊膜滴眼液治疗早期兔眼热烧伤的实验观察. *牡丹江医学院学报* 2011;1(32):45-46
- 16 赵敏,陈家祺,杨培增.大鼠角膜热烧伤后眼组织平片的免疫组织化学研究. *眼科学报* 1997;13(2):70-74