

# bFGF 缓释微囊颗粒诱导角膜新生血管形成治疗兔大泡性角膜病变

张海良<sup>1</sup>, 马翔<sup>2</sup>, 王琪<sup>1</sup>, 孙洪臣<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(116044)中国辽宁省大连市,大连医科大学研究生院眼科;<sup>2</sup>(116011)中国辽宁省大连市,大连医科大学附属第一医院眼科

作者简介:张海良,硕士研究生。

通讯作者:马翔,教授,主任,医学博士. xma9467@vip. sina. com

收稿日期:2009-07-20 修回日期:2009-09-23

## Experimental study of treatment of bullous keratopathy by corneal neovascularization induced by slow release of bFGF micropellets in rabbit

Hai-Liang Zhang<sup>1</sup>, Xiang Ma<sup>2</sup>, Qi Wang<sup>1</sup>, Hong-Chen Sun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Graduate School of Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xiang Ma. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. xma9467@vip. sina. com

Received:2009-07-20 Accepted:2009-09-23

### Abstract

• AIM: To observe corneal neovascularization (CNV) induced by slow release of bFGF micropellets for the treatment of bullous keratopathy.

• METHODS: The model of bullous keratopathy was built by perfusing anterior chamber with 0.5g/L benzalkonium bromide solution. And then implant bFGF slow release micropellets to cornea propria of lagophthalmos with affection in order to induce CNV. Observe the degree of corneal edema and corneal bullous.

• RESULTS: Four weeks after implanting bFGF slow release micropellets to cornea propria, the central corneal thickness of the cornea was  $2.61 \pm 0.25$  (CT), corneal edema score was 0, and CNV score was 0. The bubble presented absorbability changes.

• CONCLUSION: The implantation of bFGF slow release micropellets to cornea propria in rabbit with bullous keratopathy can rapidly induce CNV. Moreover, the clinical symptoms of pathological cornea relieve gradually following with the growth of CNV. Therefore, the experimental method may provide another kind of idea and method for the treatment of bullous keratopathy.

• KEYWORDS: bullous keratopathy; corneal new vessels; basic fibroblast growth factor

Zhang HL, Ma X, Wang Q, *et al*. Experimental study of treatment of bullous keratopathy by corneal neovascularization induced by slow release of bFGF micropellets in rabbit. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(10):1861-1864

### 摘要

目的:观察 bFGF 诱导角膜新生血管形成,对兔大泡性角膜病变的治疗作用。

方法:采用 0.5g/L 苯扎溴铵溶液(BAKB)前房灌注复制兔大泡性角膜病变模型。然后将 bFGF 缓释微囊颗粒植入病变兔眼的角膜基质层间,诱导角膜新生血管生长,观察随角膜新生血管的形成,病变角膜水肿及大泡的改变。

结果:在微囊颗粒植入后 4wk 病变角膜中央厚度  $2.61 \pm 0.25$ (CT),角膜水肿度评分 0 分,角膜新生血管评分 0 分,病变大泡呈吸收性改变。

结论:大泡性角膜病变动物模型角膜基质层间植入 bFGF 缓释微囊颗粒,能够较为迅速的诱导角膜新生血管形成。同时,伴随 CNV 的生长,病变角膜的临床症状逐渐缓解。因此,该实验方法可能为大泡性角膜病变的治疗提供了另一种思路和方法。

关键词:大泡性角膜病变;角膜新生血管;碱性成纤维细胞生长因子

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2009.10.007

张海良,马翔,王琪,等. bFGF 缓释微囊颗粒诱导角膜新生血管形成治疗兔大泡性角膜病变. 国际眼科杂志 2009;9(10):1861-1864

### 0 引言

大泡性角膜病变(bullous keratopathy, BK)是角膜内皮细胞功能失代偿的晚期表现。系指角膜上皮及实质层长期持续水肿,致使角膜上皮和上皮下形成水泡,它并非是单独的疾病,而是由多种眼病引起的。随着白内障摘除和人工晶状体植入技术的广泛开展以及新的内眼手术方法的探讨和应用,大泡性角膜病变呈逐渐增多的趋势<sup>[1,2]</sup>。我们采用碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)缓释微囊颗粒角膜层间植入诱发角膜血管化<sup>[3]</sup>的方法来消除水肿,依靠新生血管来吸收角膜内过多的水份,从而减轻临床症状。

### 1 材料和方法

1.1 材料 健康成年新西兰白兔 30 只,雌雄不限,体质量 2~2.5kg,眼部经裂隙灯检查,屈光间质透明。饲养温度

表1 兔眼 bFGF 缓释微囊颗粒植入后中央角膜厚度 ( $\bar{x} \pm s, CT$ )

分组	BAKB 灌注后 2wk	植入后 1wk	植入后 2wk	植入后 4wk
空白组	3.55 ± 0.20	3.54 ± 0.17	3.54 ± 0.19	3.52 ± 0.18
对照组	3.56 ± 0.18	3.56 ± 0.20	3.56 ± 0.13	3.55 ± 0.18
实验组	3.59 ± 0.19	3.10 ± 0.15	2.64 ± 0.15	2.61 ± 0.25

表2 兔眼角膜水肿度和新生血管评分分析 n

	空白组	对照组	组 A	组 B	组 C
角膜水肿					
1	0	0	0	2	2
2	0	0	3	8	9
3	0	1	3	2	1
4	12	11	6	0	0
新生血管					
1	0	0	8	1	1
2	0	0	4	11	11
3	0	0	0	0	0

20℃~25℃,自动摄食和饮水,昼夜自然光照,由大连医科大学实验动物中心提供。手术显微镜(ASOM-3C 中科院成都科奥达光电技术有限公司),照相裂隙灯显微镜(YZ5E-I 成都六六视觉医疗器械有限公司),光学显微镜(BX41 Olympus 杭州诺丁科学器材有限公司),超净工作台(Boxun 上海博讯实业有限公司医疗设备厂),三蒸水蒸馏器(PL512302 Pall Corp, Germany),恒温水浴箱(GB11241-89 北京医疗设备厂)。bFGF(SIGMA-ALDRICH, USA),吸收性明胶海绵(金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂),0.5g/L 苯扎溴铵溶液(北京海德润制药有限公司),PBS(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.2 方法** 取实验用新西兰白兔,盐酸氯胺酮 30mg/kg 和地西洋 3mg/kg im 麻醉。随机 1 眼盐酸奥布卡因滴眼液眼表麻醉后分别在角膜缘 10:00~12:00 位前房穿刺,0.5g/L 苯扎溴铵溶液 3mL 自 10:00 位穿刺口灌注,2:00 位引流,共 40s;之后用生理盐水 10mL 冲洗前房,共 60s;阿托品和金霉素眼膏涂眼。术后氯霉素眼液滴眼 4 次/d<sup>[4]</sup>。在光学显微镜下用无菌显微剪将医用明胶海绵片剪成 1mm×1mm×0.5mm 的小片,浸入 4℃ PBS 缓冲液过夜后,用无菌滤纸将水份吸干。滴加 500mg/L PBS bFGF 1μL 于明胶海绵小片上(对照组明胶海绵小片上只滴加 PBS 缓冲液),完全吸收后置于超净台内干燥 48h。将此小丸浸入 20g/L 琼脂糖溶液包裹后取出再置于超净台内干燥 48h 备用<sup>[5,6]</sup>。实验组每个小丸含 bFGF 500mL,对照组不含 bFGF。将成功制成大泡性角膜病变模型的新西兰白兔 30 只,于模型建立的 2wk 随机分为 3 组,每组 10 兔 10 眼,即空白组,对照组,实验组。实验组兔患眼植入含 bFGF 的缓释微囊,对照组植入不含 bFGF 的微囊。所有步骤均在无菌条件下进行。盐酸氯胺酮 30mg/kg 和地西洋 3mg/kg im 注射麻醉;盐酸奥布卡因滴眼液眼表麻醉。角膜中央做长约 3mm 的横行切口,深达 1/2 角膜厚度,用 2mm 宽巩膜隧道刀向大泡病变明显处角膜缘方向做潜行隧道,隧道顶端距角膜缘 3mm 处停止,用显微镜将 bFGF 缓释微囊植入隧道顶端<sup>[7]</sup>。术毕眼裂涂阿托品和金霉素眼膏。术后滴氯霉素眼液 4 次/d,每周裂隙灯下观察眼表情况并评分,于术后 4wk 处死实验兔。观察:(1)角膜中央厚度<sup>[8]</sup>,固定裂隙灯显微镜的裂隙宽度及光线投射角度,以正常兔角膜厚度为标准(记为 1CT),观察不同时间段各组角膜中央厚度;(2)角膜水肿度<sup>[8]</sup>,无水腫记为 0 分,基质轻度水肿增厚记为 1 分,弥漫基质水肿记为 2 分,出现上皮小水泡记为 3 分,大泡性角膜病变记为 4 分;(3)角膜新生血管<sup>[9]</sup>,0 分:无新生血管;1 分:新生血管位于角膜缘内 2mm;2 分:新生血管位于角膜周边,≤1/2 象限;3 分:新生血管 >2 分标准。

统计学分析:数据采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析;计数资料采用非参秩和检验。 $P < 0.05$  具有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 临床观察** BAKB 灌注后 24h 内,所有角膜明显水肿混浊;4d 角膜大泡出现,2wk 时角膜大泡较多,混浊明显,虹膜纹理不可见,呈现典型大泡性角膜病变表现(图 1A, B)。实验组 bFGF 缓释微囊角膜层间植入平均  $4 \pm 0.81d$  可见新生血管开始从角巩膜缘长出,并向植入物方向伸展,且血管成束生长,逐渐包绕植入物,新生血管范围局限,约 10d 时血管生长最为密集,以后数天无明显变化,观察至第 4wk 仍无明显生长或自行消退的趋势(图 1C, D)。随着角膜新生血管(CNV)的形成,病变角膜水肿逐渐减轻,混浊程度逐渐降低,病变大泡呈吸收性改变。空白组与对照组微囊植入前后角膜病变无明显变化(图 1E, F)。

**2.2 角膜中央厚度** 植入前(即 BAKB 灌注后 2wk),各组中央角膜厚度比较,无统计学差异( $P = 0.607, P = 0.752, P = 0.842$ );植入后 1, 2, 4wk,空白组与对照组中央角膜厚度比较仍然无统计学差异( $P = 0.733, P = 0.815, P = 0.755$ ),实验组与空白组和对照组中央角膜厚度比较具有明显的统计学差异( $P = 0.000$ )。同时,实验组植入 bFGF 缓释微囊颗粒后 1, 2, 4wk 自身比较,植入 1wk 时与植入 2, 4wk 时比较,中央角膜厚度有统计学差异( $P = 0.000, P = 0.000$ ,表 1)。而植入 2wk 时与 4wk 时中央角膜厚度比较无统计学差异( $P = 0.695$ ,图 1D-F)。

**2.3 角膜水肿度** 植入 bFGF 缓释微囊颗粒前各组角膜水肿度评分均为 4 分,植入微囊颗粒后 4wk,空白组与对照组角膜水肿度比较无统计学差异,实验组与空白组和对照组角膜水肿度比较具有明显的统计学差异( $P = 0.000$ )。同时实验组自身 A, B, C 比较, A 与 B 和 C 角膜水肿度比较有统计学差异( $P = 0.000, P = 0.000$ ,表 2), B 和 C 角膜水肿度比较没有统计学差异( $P = 0.851$ ,图 1D-F)。

**2.4 角膜新生血管** 植入微囊颗粒后 4wk,空白组与对照组角膜新生血管比较无统计学差异,实验组与空白组和对照组角膜新生血管比较具有明显的统计学差异( $P = 0.000$ )。实验组自身 A, B, C 比较, A 与 B 和 C 角膜新生血管比较有统计学差异( $P = 0.000, P = 0.000$ ,表 2), B 和 C 角膜新生血管比较无统计学差异(1 图 D-F)。

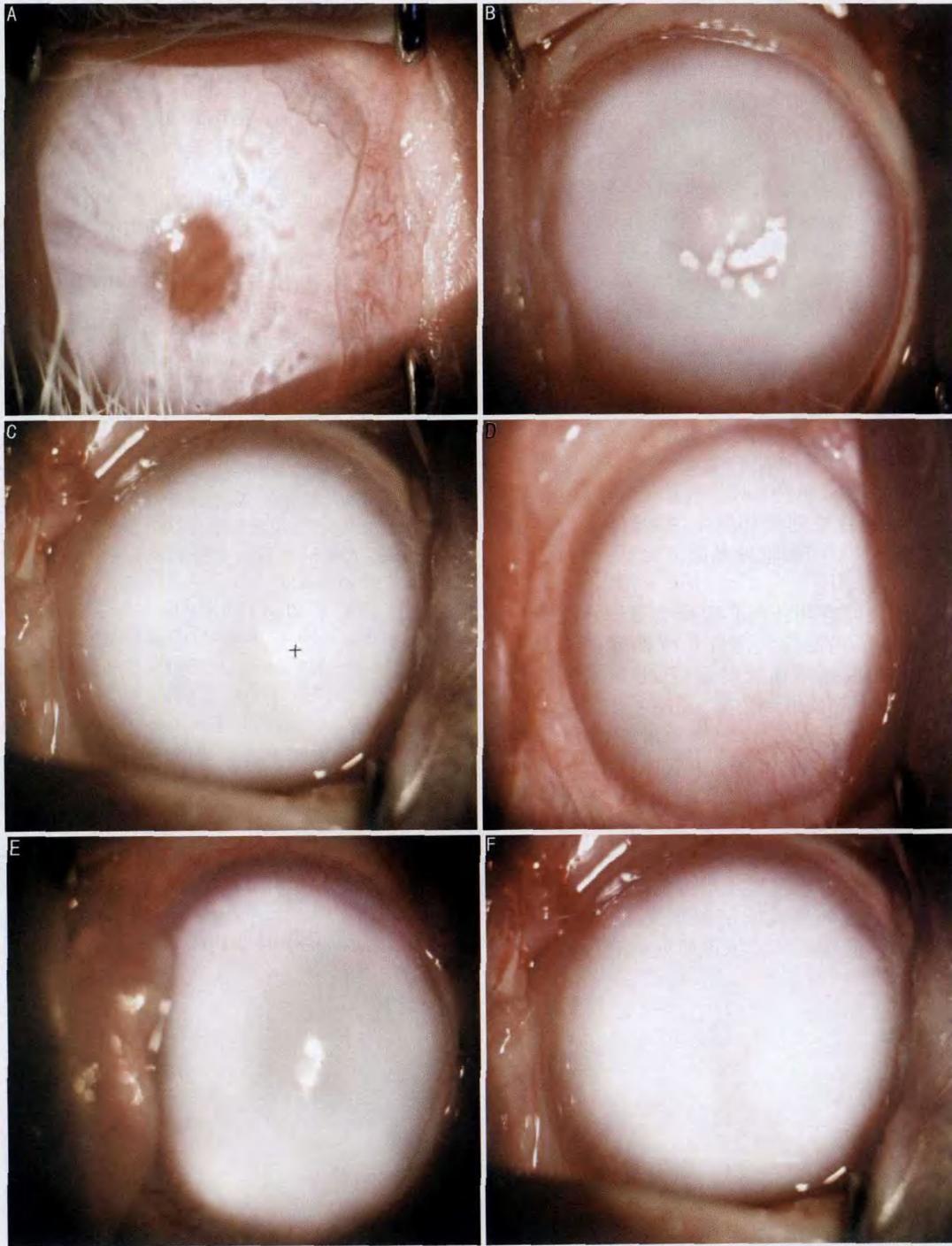


图1 兔眼角膜图片 A:正常兔眼角膜;B:微囊植入前;C:微囊植入1d;D:实验组微囊植入4wk;E:空白组微囊植入4wk;F:对照组微囊植入4wk

### 3 讨论

大泡性角膜病变的发生主要在于角膜内皮细胞广泛损害后,角膜内皮功能失代偿,造成角膜上皮下水泡。因为角膜上皮层的神经极为丰富,角膜感觉异常灵敏,所以受到水肿的强烈刺激后,会出现严重的畏光、流泪、眼痛等刺激症状<sup>[10]</sup>。基于上述发病机制,解决的根本办法应是恢复其角膜内皮功能。穿透性角膜移植 (penetrating keratoplasty, PKP) 是一种有效的治疗方法<sup>[11,12]</sup>,它能从根本上消除角膜内皮失衡的病因,对眼压正常、光定位良好的患者,穿透性角膜移植具有缓解疼痛,改善视功能和恢复正常眼表结构等特点,是目前治疗大泡性角膜病变的

首选方案。但是,对于那些眼外伤或多次内眼手术后眼前节破坏严重,或伴有继发性青光眼的患者来说,其视功能已无法恢复,因此穿透性角膜移植已非首选。为解除这部分患者的痛苦,人们在不断寻求其它方法。兔角膜内皮细胞损伤后且有较强再生能力,但苯扎溴铵溶液前房灌注后可完全破坏角膜内皮细胞,观察 6mo 角膜仍水肿,内皮细胞缺损明显<sup>[13]</sup>。本动物模型在 Maurice 的基础上进行改进,使重复性更好,易于标准化。空白组 4wk 时角膜仍明显水肿、可见大泡,基本符合大泡性角膜病变的临床改变,为实验观察提供了模型基础。我们通过 bFGF 缓释微囊颗粒兔眼角膜基质层间植入,诱导角膜新生血管形成治疗

大泡性角膜病变。术后观察,随着角膜新生血管的形成,病变角膜水肿减轻,透明度增加,病变大泡呈吸收性改变。除角膜新生血管外,无虹膜新生血管、眼压增高等不良反应<sup>[14]</sup>。bFGF是包含146个氨基酸的具有复杂功能的单链肽,在一系列体外实验中,被证实具有对血管内皮细胞分化、增生、迁移和趋化的作用。Vogten等<sup>[15]</sup>的体外实验表明:bFGF诱导微血管内皮细胞产生大量的纤维蛋白溶解酶原激活剂(t-PA),在血管生成早期起中心作用,t-PA将纤维蛋白溶解酶原转化成具有酶活性的纤维蛋白溶解酶,后者又可以激活胶原酶,溶解新生血管起始缘的基膜,并导致内皮细胞进入三维的胶原基质,形成新的毛细血管芽。由此可见,bFGF在诱导新生血管形成的过程中起重要作用。明胶海绵长期以来一直应用于外科临床,用来止血和促进创口愈合,近年来常常出现在血管生成的研究领域。明胶海绵与bFGF组合在一起为血管生成提供了生长因子的储备库和血管内皮细胞的生长支架。明胶海绵能够维持其形状和大小不变约4wk<sup>[16]</sup>;琼脂糖的包裹则使得bFGF能够缓慢地释放到微环境中,持续作用。其中琼脂糖不含任何生长因子和细胞外基质成分,因此对病变角膜不产生任何治疗作用。

综合上述因素,我们推测:bFGF缓释微囊诱导产生角膜新生血管形成能够成功治疗大泡性角膜病变的原因主要有3种:(1)随着角膜新生血管的形成,血管内的修复生长因子与炎症因子一起被带到角膜,提高了角膜局部的抗感染能力,有利于炎症反应的消退和水肿的减轻;(2)角膜内长时间堆积的代谢产物和病变大泡内的水分,也可以通过这些新生血管进行吸收,进而运输到肝脏等部位代谢掉,起到一个生物泵的作用;(3)角膜的血管化过程,本身就是角膜基质纤维结缔组织增生的过程,这种增生过程能够产生良好的屏障作用,达到阻止水份向前渗透至角膜上皮下,从而阻止了大泡的形成或使角膜大泡痊愈,不再复发,进而缓解了临床症状。所以说该研究方法可能是治

疗部分大泡性角膜病变的一种新的理想技术,其临床应用将是我们下一步的研究计划。

#### 参考文献

- 1 Shimazaki J, Amano S, Uno T, *et al*. National survey on bullous keratopathy in Japan. *Cornea* 2007;26(3):274-278
- 2 刘明娜,史伟云,金绘祥,等. 324例大泡角膜病变病因分析. *临床眼科杂志* 2007;15(3):209-211
- 3 王娟. 角膜新生血管形成机制. *临床眼科杂志* 2008;16(1):88-90
- 4 邓世靖,孙旭光,张岩,等. 角膜基质内羊膜移植治疗兔大泡性角膜病变. *中华眼科杂志* 2004;40(10):701-703
- 5 张黎,胡燕华. 新的角膜囊袋法诱生的兔角膜新生血管模型. *眼科研究* 2006;24(3):260-262
- 6 McCarty MF, Baker CH, Bucana CO, *et al*. Quantitative and qualitative *in vivo* angiogenesis assay. *Int J Oncol* 2002;21(2):5-10
- 7 Morbidelli L, Ziche M. The rabbit corneal pocket assay for the study of angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2004;117:147-151
- 8 刘海俊,钟世镇,余磊,等. 角膜缘干细胞移植治疗兔眼表碱烧伤的实验研究. *中国临床解剖学杂志* 2003;21(4):365-367
- 9 龙崇德,葛坚,高前应,等. 胚胎干细胞联合羊膜移植治疗早期严重眼化学伤的研究. *中山大学学报* 2005;26(2):188-192
- 10 伍志琴. 大泡性角膜病变的病因与临床治疗进展. *眼科新进展* 2007;27(8):625-629
- 11 Xie L, Song Z, Zhao J, *et al*. Indications for penetrating keratoplasty in north China. *Cornea* 2007;26(9):1070-1073
- 12 苗云坤,罗庭浩,吴荣翰. 大泡性角膜病变14例手术治疗. *国际眼科杂志* 2004;4(2):347-348
- 13 Maurice D, Perlman M. Permanent destruction of the corneal endothelium in the rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16(7):646-649
- 14 Tong S, Yuan F. Dose response of angiogenesis 10 basic fibroblast growth factor in rat corneal pocket assay: 1. Experimental characterizations. *Microvasc Res* 2007;75(1):10-15
- 15 Vogten JM, Reijkerkerk A, Meijers JC, *et al*. The role of the fibrinolytic system in corneal angiogenesis. *Angiogenesis* 2003;6(4):311-316
- 16 Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. Assay for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther* 1991;51:1-11