

· 实验研究 ·

康柏西普对兔眼准分子激光角膜切削术术后角膜上皮雾状混浊的影响

刘蓓¹ 张磊¹ 刘玉震¹ 高洪莲² 隋文君¹¹滨州医学院附属医院眼科 256600; ²滨州医学院附属医院临床医学实验中心 256600

通信作者:张磊, Email: zhangleisd@263.net

【摘要】 目的 探讨康柏西普(conbercept)对兔眼准分子激光角膜切削术术后角膜上皮雾状混浊(haze)的影响。方法 采用随机数字表法将 64 只纯种新西兰大白兔分为单纯手术组、生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组和 conbercept 1.0 mg 组,每组 16 只,均行右眼准分子激光角膜切削术(PRK),术后单纯手术组不做任何处理,其余 3 个组分别给予术眼结膜下注射生理盐水 0.05 ml、conbercept 0.5 mg (0.05 ml) 和 conbercept 1.0 mg (0.10 ml),另选取 8 只兔作为正常对照组。术后裂隙灯显微镜下观察角膜上皮愈合情况及 haze 程度并进行 Fantes 分级,各手术组术后 1 周和 4 周分别空气栓塞法处死 8 只,正常对照组处死 4 只,取其角膜组织行苏木精-伊红染色,并通过免疫组织化学法检测角膜组织中转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的表达。结果 术后兔眼角膜上皮均于 3~5 d 完全愈合,各组兔眼术后角膜上皮愈合时间比较,差异无统计学意义($F=0.37, P=0.77$)。在观察期间,各手术组 haze 均于术后 4 周时最明显,conbercept 1.0 mg 组 haze 最严重,其次为单纯手术组和生理盐水组,conbercept 0.5 mg 组 haze 较其他手术组明显减轻,各组兔眼不同时间点 haze 分级比较,差异均有统计学意义($F_{\text{组别}}=20.114, P=0.000; F_{\text{时间}}=8.084, P=0.006$)。苏木精-伊红染色示 PRK 术后 1 周,术区角膜上皮细胞增生,细胞排列紊乱、形态各异,浅基质层成纤维细胞数量增多,胶原纤维排列紊乱。角膜上皮及浅基质层的增生程度由强到弱依次为 conbercept 1.0 mg 组、单纯手术组和生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组。术后 4 周各手术组术区角膜组织结构较术前 1 周紊乱,各组增生程度次序同术前 1 周。免疫组织化学法检测显示,术后 1 周 conbercept 1.0 mg 组术区角膜组织中 TGF- β_1 、 α -SMA 和 MMP-2 的表达最强,其次为单纯手术组和生理盐水组,conbercept 0.5 mg 组次之,各手术组 3 种因子的表达较正常对照组明显增强,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 Conbercept 适量结膜下注射可抑制 haze 的形成,抑制角膜上皮和浅基质层的增生,过量则促进 haze 的形成,促进角膜上皮和浅基质层的增生。

【关键词】 准分子激光角膜切削术; 康柏西普; 角膜上皮雾状混浊; 转化生长因子- β_1 ; α -平滑肌肌动蛋白; 基质金属蛋白酶-2

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.02.005

Effects of conbercept on haze formation after photorefractive keratectomy in rabbit eyesLiu Bei¹, Zhang Lei¹, Liu Yuzhen¹, Gao Honglian², Sui Wenjun¹¹Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, China; ²Clinical Medical Experimental Center, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, China

Corresponding author: Zhang Lei, Email: zhangleisd@263.net

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of conbercept on rabbit's haze after photorefractive keratectomy (PRK). **Methods** Sixty-four pedigree New Zealand white rabbits were randomly divided into PRK group, normal saline solution group, conbercept 0.5 mg group, conbercept 1.0 mg group, with 16 rabbits in each group. PRK was performed on right eyes, PRK group only received PRK, the other three surgery groups were given postoperative subconjunctival injection of 0.05 ml normal saline solution, 0.5 mg (0.05 ml) conbercept and 1.0 mg (0.10 ml) conbercept, respectively. In addition, another 8 rabbits were randomly chosen as normal control group. The healing of postoperative corneal epithelial was observed by slit lamp biomicroscope, and the degrees of haze were graded based on Fantes. Eight rabbits in the surgery groups and 4 rabbits in the normal control group were killed in the first week and the fourth week. The corneal tissue was stained by hematoxylin-eosin, and the expressions of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), α -smooth muscle actin (α -SMA) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were detected by immunohistochemistry. The use and feeding of experimental animals followed the Relevant Regulations of

the Animal Management Committee of Binzhou Medical University. This study protocol was approved by Ethic Committee of the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University (No. 201701-08). **Results** Corneal epithelium of all operative rabbits healed completely at 3-5 days and no significant difference in healing time between the groups after operation ($F=0.37, P=0.77$). The degree of haze in each surgery group reached the highest value at about 4 weeks after operation, and haze in the conbercept 1.0 mg group was the most serious, followed by PRK group and normal saline solution group, haze in conbercept 0.5 mg group was significantly alleviated ($F_{\text{group}}=20.114, P=0.000; F_{\text{time}}=8.084, P=0.006$). Hematoxylin-eosin staining showed that corneal epithelial cells and fibroblasts in superficial stroma proliferated in one week after PRK, which lead to the disorder of cells and collagen fibers, and the extent of hyperplasia was the same as that of haze. Immunohistochemistry showed that at one week after operation, the expressions of factors in PRK group and normal saline solution group were apparently lower than that of conbercept 1.0 mg group, but were apparently higher than that of conbercept 0.5 mg group, and the expressions of the factors were the weakest in normal control group, with significant differences between them (all at $P<0.05$). **Conclusions** Subconjunctival injection of appropriate conbercept can inhibit the formation of haze and the proliferation of corneal epithelium and superficial stroma, but overdose of conbercept leads to opposite effects.

[Key words] Photorefractive keratectomy; Conbercept; Haze; Transforming growth factor- β_1 ; α -Smooth muscle actin; Matrix metalloproteinase-2

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.02.005

准分子激光角膜切削术 (photorefractive keratectomy, PRK) 作为一种简单、安全、有效的屈光矫正手术, 不存在准分子激光角膜原位磨镶术 (laser in situ keratomileusis, LASIK) 相关的角膜瓣相关并发症^[1], 较少导致继发性圆锥角膜, 无飞秒激光制瓣的并发症及局限性^[2-3]。表浅角膜切削术后角膜生物力学较稳定, 不易出现角膜扩张、视力回退等, 随着围手术期处理、术后疼痛预防的完善及 Trans PRK 的出现, 表层术式有回归的趋势^[4-6]。然而, 角膜上皮雾状混浊 (haze) 是 PRK 术后的主要并发症, 仍有不少患者术后出现不同程度的 haze。目前有多种防治 haze 的方法, 丝裂霉素 C 为抑制 haze 形成的主要药物^[7], 但由于丝裂霉素 C 本身的不良反应^[8] 及目前国内该药物的缺乏, 因此寻求更安全、有效的丝裂霉素 C 替代药品具有重要意义。有实验表明, 人源化单克隆 IgG 贝伐单抗 (bevacizumab) 除了可抑制新生血管外, 还可抑制转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 的表达, 减少 haze 的形成^[9-10]。新一代抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物康柏西普 (conbercept) 为中国仓鼠卵巢细胞表达系统产生的重组融合蛋白, 具有多靶点、亲和力强、半衰期长等优点, 但其对 PRK 术后 haze 的形成是否有影响尚不明确。本研究探讨 conbercept 对抑制 haze 形成的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 普通级纯种新西兰大白兔 64 只 (济南西岭角养殖繁育中心提供), 体质量 2.0 ~ 2.5 kg, 裂隙灯显微镜检查排除眼前节疾病。采用随机数字表法将其分为单纯手术组、生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组、conbercept 1.0 mg 组, 每组 16 只, 另取 8 只未经任何处理的新西兰大白兔作为正常对照组, 均取右眼为实验眼。实验动物的使用和喂养遵循滨州医学院动物管理委员会相关规定。本研究方案经滨州医学院附属医院伦理委员会审批 (批文号: 201701-08)。

1.1.2 主要试剂及仪器 10 mg/ml conbercept (成都康弘生物科技有限公司); 质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液 (日本参天制药株式会社); 质量分数 0.3% 氧氟沙星眼膏 (沈阳兴齐眼药股份有限公司); 小鼠抗兔 TGF- β_1 单克隆抗体 (ab190503)、小鼠抗兔 α -SMA 单克隆抗体 (ab7817)、小鼠抗兔 MMP-2 单克隆抗体 (ab2462) (英国 Abcam 公司); 免疫组织化学 SABC 试剂盒 (质量分数 5% BSA 封闭液、生物素标记山羊抗小鼠 IgG、SABC 复合物工作液) (SA1021, 武汉博士德生物工程有限公司); DAB 显色剂 (P0202, 上海碧云天生物技术有限公司)。VISA STAR S4 准分子激光仪 (美国 AMO 公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔 PRK 模型的制作与分组 术前各手术组 16 只实验兔均经耳缘静脉缓慢推注质量分数 3% 戊巴比妥钠 30 ~ 40 mg/kg 行全身麻醉, 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点右眼行表面麻醉, 麻醉成功后在准分子激光系统下行右眼 PRK 手术。激光参数: 采用准分子激光治

疗性角膜切削术 (phototherapeutic keratectomy, PTK) 模式去除上皮, 能量设置为 $160 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, 矫正度数为 -10.0 D , 角膜中央区切削直径为 6.0 mm 。术后用平衡盐溶液充分冲洗角膜表面, 干吸水绵签吸去角膜表面水分, 覆盖角膜接触镜, 0.3% 氧氟沙星眼膏涂眼, 每日 3 次。术后生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组和 conbercept 1.0 mg 组分别给予右眼结膜下注射生理盐水 0.05 ml 、conbercept 0.5 mg (0.05 ml) 和 conbercept 1.0 mg (0.1 ml), 单纯手术组不给予任何处理。

1.2.2 裂隙灯显微镜下观察术后角膜上皮愈合时间及 haze 分级 术后每日在裂隙灯显微镜下观察角膜愈合情况, 记录各组兔眼术后角膜上皮愈合时间并进行比较。术后 1 周及 4 周分别进行 haze 分级。Fantes 分级标准: 角膜透明为 0 级; 斜照法可见轻度混浊为 0.5 级; 裂隙灯显微镜下容易发现角膜混浊, 不影响观察虹膜纹理为 1 级; 角膜混浊, 轻度影响观察虹膜纹理为 2 级; 角膜明显混浊, 中度影响观察虹膜纹理为 3 级; 角膜重度混浊, 不能窥见虹膜纹理为 4 级^[11-12]。

1.2.3 标本采集及石蜡切片制作 术后 1 周和 4 周单纯手术组、生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组、conbercept 1.0 mg 组分别任意选取 8 只实验兔空气栓塞法处死, 正常对照组任意选取 4 只实验兔空气栓塞处死, 立即分离右眼角膜放入质量分数 4% 多聚甲醛中固定后石蜡包埋, $4 \mu\text{m}$ 厚连续切片。

1.2.4 苏木精-伊红染色观察角膜组织病理学变化

石蜡切片逐级脱蜡至水, 苏木素染色 5 min , 自来水冲洗 1 min , 体积分数 1% 盐酸分化 2 s , 自来水冲洗 15 min , 伊红染色 2 min , 自来水冲洗 1 min , 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 普通光学显微镜下观察并拍照。

1.2.5 免疫组织化学法检测角膜中 TGF- β_1 、 α -SMA 及 MMP-2 的表达 石蜡切片逐级脱蜡至水, PBS 洗 3 次, 每次 5 min ; 高压修复抗原, PBS 洗 3 次, 每次 5 min ; 体积分数 3% 过氧化氢溶液室温孵育 10 min 消除内源性过氧化物酶活性, PBS 洗 3 次, 每次 5 min ; 滴加 5% BSA 封闭液 37°C 孵育 30 min ; 甩去封闭液, 分别滴加小鼠抗兔 TGF- β_1 ($1:50$)、 α -SMA ($1:100$) 及 MMP-2 ($1:100$) 一抗, 4°C 冰箱中孵育过夜, PBS 洗 3 次, 每次 5 min ; 滴加生物素标记山羊抗小鼠 IgG 工作液, 37°C 孵育 30 min , PBS 洗 3 次, 每次 5 min ; 滴加 SABC 复合物工作液, 37°C 孵育 30 min , PBS 洗 3 次, 每次 5 min ; DAB 显色, 苏木素复染 2 min , 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察并拍照。组织标本中出现棕黄色染色为阳性判定标准。光学显微镜下

观察各组标本, 400 倍镜下每张切片任意选取 3 个视野, 应用 Image-Pro Plus 图像分析系统对各标本进行图像采集, 得出平均吸光度 (A) 值, 计数各蛋白的阳性细胞个数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。术后角膜上皮完全愈合时间数据经 W 检验证实呈正态分布, 以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 经 Levene 检验证实方差齐性, 各手术组术后角膜上皮完全愈合时间比较采用单因素方差分析。术后不同时间点 haze 分级及角膜组织中表达 TGF- β_1 、 α -SMA 和 MMP-2 的阳性细胞数及平均 A 值数据经 W 检验证实呈正态分布, 以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 各组样本均数经 Levene 检验证实方差齐性, 各组术后不同时间点 haze 分级及角膜中表达 TGF- β_1 、 α -SMA 和 MMP-2 阳性表达细胞数的比较采用两因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组兔眼术后角膜上皮愈合时间比较

单纯手术组、生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组和 conbercept 1.0 mg 组兔眼术后第 2 天可见结膜轻度充血、角膜水肿等炎症反应, 角膜上皮均在术后第 3 ~ 5 天完全愈合。单纯手术组、生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组、conbercept 1.0 mg 组兔眼术后角膜上皮愈合时间分别为 (4.06 ± 0.85)、(4.00 ± 0.97)、(3.94 ± 0.77) 和 (4.25 ± 0.93) d, 各组兔眼术后角膜上皮愈合时间比较, 差异无统计学意义 ($F = 0.37, P = 0.77$)。

2.2 各组兔眼术后角膜 haze 分级比较

单纯手术组、生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组和 conbercept 1.0 mg 组均在术后 1 周出现不同程度的 haze, 4 周时 haze 症状最明显。术后 1 周和 4 周, conbercept 1.0 mg 组 haze 症状最严重, 其次为单纯手术组和生理盐水组, conbercept 0.5 mg 组 haze 症状较其他手术组明显减轻, 正常对照组无 haze 形成 (图 1)。各组兔眼不同时间点 haze 分级的比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 20.114, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 8.084, P = 0.006$), 其中 conbercept 0.5 mg 组 haze 分级较单纯手术组、生理盐水组明显降低, conbercept 1.0 mg 组 haze 分级较单纯手术组、生理盐水组明显升高, conbercept 0.5 mg 组 haze 分级较 conbercept 1.0 mg 组明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 单纯手术组和生理盐水组 haze 分级比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

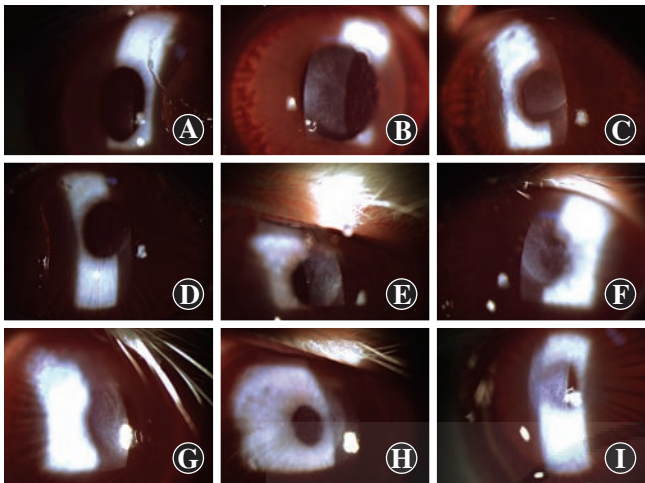


图 1 眼前节照相观察各组兔眼术后角膜 haze 正常对照组无 haze 形成;单纯手术组、生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组、conbercept 1.0 mg 组均在术后 1 周出现不同程度的 haze,4 周时 haze 症状最明显。术后 1 周和 4 周,conbercept 1.0 mg 组 haze 最严重,其次为单纯手术组和生理盐水组 A:正常对照组 B:术后 1 周单纯手术组 C:术后 1 周生理盐水组 D:术后 1 周 conbercept 0.5 mg 组 E:术后 1 周 conbercept 1.0 mg 组 F:术后 4 周单纯手术组 G:术后 4 周生理盐水组 H:术后 4 周 conbercept 0.5 mg 组 I:术后 4 周 conbercept 1.0 mg 组

表 1 各组兔眼不同时间点 haze 分级比较 (mean±SD)

组别	眼数	术后不同时间点 haze 分级	
		1 周	4 周
单纯手术组	8	1.81±0.92	2.63±1.06
生理盐水组	8	1.69±0.96	2.38±1.06
conbercept 0.5 mg 组	8	0.63±0.64 ^{ab}	0.94±0.73 ^{ab}
conbercept 1.0 mg 组	8	2.88±1.20 ^{abc}	3.63±0.74 ^{abc}

注: $F_{组别} = 20.114, P = 0.000; F_{时间} = 8.048, P = 0.006$. 与单纯手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与生理盐水组比较, ^b $P < 0.05$; 与 conbercept 0.5 mg 组比较, ^c $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) haze: 角膜上皮雾状混浊; conbercept: 康柏西普

2.3 各组角膜组织病理学变化

苏木精-伊红染色观察结果显示,正常角膜上皮为 4~5 层,上皮细胞及胶原纤维排列规则,基底膜完整规则。术后 1 周,conbercept 0.5 mg 组角膜上皮细胞较正常对照组稍增多,细胞排列轻度紊乱,基底膜基本完整规则,基质层成纤维细胞轻度增多,胶原纤维轻度紊乱;术后 4 周,角膜上皮增生至 5~6 层,上皮细胞形态各异,基底膜尚完整,基质层成纤维细胞较前增多。术后 1 周,单纯手术组及生理盐水组角膜上皮细胞及基质层成纤维细胞增生明显,细胞排列明显紊乱,基底膜尚规则,胶原纤维明显紊乱;术后 4 周,角膜上皮为 7~8 层,上皮细胞形态各异,基底膜较前紊乱,连续性较差,基质层成纤维细胞较前增多,胶原纤维较前紊乱。术后 1 周,conbercept 1.0 mg 组增生和紊乱的程度

明显强于单纯手术组和生理盐水组;术后 4 周,角膜上皮明显增厚,为 9~10 层,且基底膜不完整(图 2)。

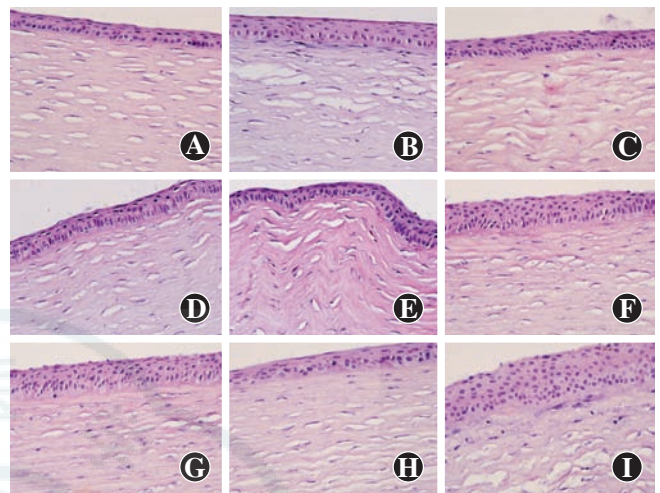


图 2 各组角膜组织病理学变化(HE ×400) 正常对照组上皮细胞、胶原纤维及基底膜排列规则;单纯手术组、生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组和 conbercept 1.0 mg 组均在术后 1 周出现不同程度的角膜上皮细胞及基质层成纤维细胞增生,上皮细胞、胶原纤维及基底膜排列紊乱,术后 4 周时最明显。术后 1 周和 4 周,conbercept 1.0 mg 组 haze 最严重,其次为单纯手术组和生理盐水组 A:正常对照组 B:术后 1 周单纯手术组 C:术后 1 周生理盐水组 D:术后 1 周 conbercept 0.5 mg 组 E:术后 1 周 conbercept 1.0 mg 组 F:术后 4 周单纯手术组 G:术后 4 周生理盐水组 H:术后 4 周 conbercept 0.5 mg 组 I:术后 4 周 conbercept 1.0 mg 组

2.4 角膜中 TGF-β₁、α-SMA 及 MMP-2 的表达比较

免疫组织化学法检测结果显示,正常角膜组织中不表达 TGF-β₁ 和 α-SMA,可表达微量的 MMP-2。术后 1 周,conbercept 0.5 mg 组 TGF-β₁、α-SMA 和 MMP-2 的表达呈弱阳性,单纯手术组和生理盐水组中等量表达 TGF-β₁、α-SMA 和 MMP-2,conbercept 1.0 mg 组 TGF-β₁、α-SMA 和 MMP-2 的表达呈强阳性。术后 4 周各手术组 TGF-β₁、α-SMA 和 MMP-2 的表达较术后 1 周时明显增强(图 3~5)。

各组兔眼不同时间点 TGF-β₁、α-SMA 和 MMP-2 阳性细胞个数及 3 种因子平均 A 值比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中术后各时间点 conbercept 0.5 mg 组 TGF-β₁、α-SMA 和 MMP-2 阳性细胞个数较单纯手术组、生理盐水组明显减少,细胞因子平均 A 值明显降低;conbercept 1.0 mg 组 TGF-β₁、α-SMA 和 MMP-2 阳性细胞个数较单纯手术组、生理盐水组明显增多,细胞因子平均 A 值明显升高;conbercept 0.5 mg 组 TGF-β₁、α-SMA 和 MMP-2 阳性细胞个数较 conbercept 1.0 mg 组明显减少,细胞因子平均 A 值明显降低;单纯手术组、生理盐水组、conbercept 0.5 mg 组和 conbercept 1.0 mg 组 TGF-β₁、α-SMA 和 MMP-2 阳性细胞个数均较

正常对照组增多,细胞因子平均 A 值明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);单纯手术组和生理盐水组 TGF- β_1 、 α -SMA 和 MMP-2 阳性细胞个数和细胞因子 A 值比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 2~4)。

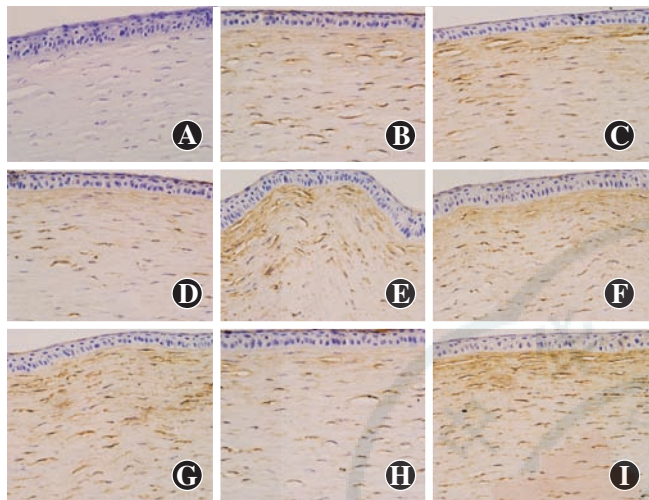


图 3 免疫组织化学法检测角膜中 TGF- β_1 的表达 (DAB $\times 400$) 正常对照组无 TGF- β_1 表达;术后 1 周,单纯手术组和生理盐水中等量表达 TGF- β_1 , conbercept 0.5 mg 组 TGF- β_1 的表达呈弱阳性, conbercept 1.0 mg 组 TGF- β_1 的表达呈强阳性;术后 4 周时各手术组 TGF- β_1 的表达较术后 1 周明显增强 A:正常对照组 B:术后 1 周单纯手术组 C:术后 1 周生理盐水组 D:术后 1 周 conbercept 0.5 mg 组 E:术后 1 周 conbercept 1.0 mg 组 F:术后 4 周单纯手术组 G:术后 4 周生理盐水组 H:术后 4 周 conbercept 0.5 mg 组 I:术后 4 周 conbercept 1.0 mg 组

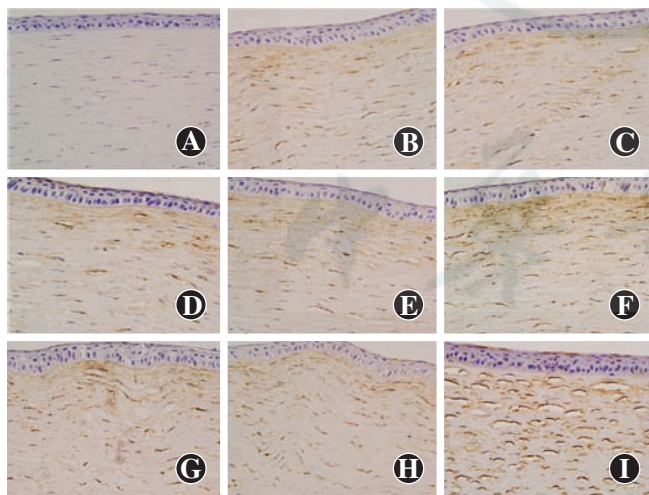


图 4 免疫组织化学法检测角膜中 α -SMA 的表达 (DAB $\times 400$) 正常对照组无 α -SMA 表达;术后 1 周,单纯手术组和生理盐水中等量表达 α -SMA, conbercept 0.5 mg 组 α -SMA 的表达呈弱阳性, conbercept 1.0 mg 组 α -SMA 的表达呈强阳性;术后 4 周,各手术组 α -SMA 的表达较术后 1 周明显增强 A:正常对照组 B:术后 1 周单纯手术组 C:术后 1 周生理盐水组 D:术后 1 周 conbercept 0.5 mg 组 E:术后 1 周 conbercept 1.0 mg 组 F:术后 4 周单纯手术组 G:术后 4 周生理盐水组 H:术后 4 周 conbercept 0.5 mg 组 I:术后 4 周 conbercept 1.0 mg 组

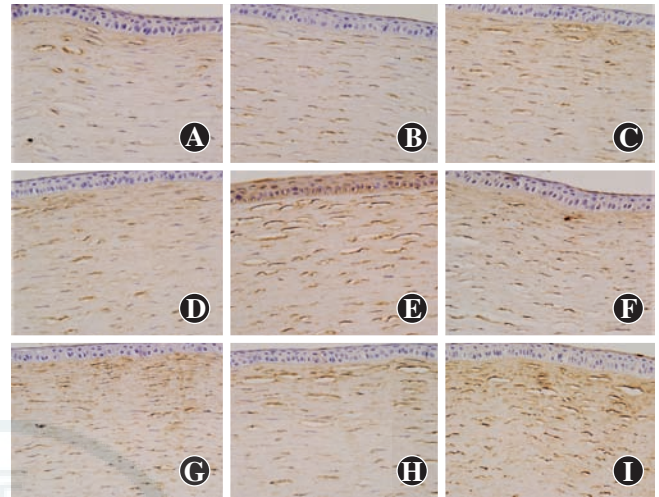


图 5 免疫组织化学法检测角膜中 MMP-2 的表达 (DAB $\times 400$) 正常对照组表达微量的 MMP-2;术后 1 周,单纯手术组和生理盐水中等量表达 MMP-2, conbercept 0.5 mg 组 MMP-2 的表达呈弱阳性, conbercept 1.0 mg 组 MMP-2 的表达呈强阳性;术后 4 周,各手术组 MMP-2 的表达较术后 1 周明显增强 A:正常对照组 B:术后 1 周单纯手术组 C:术后 1 周生理盐水组 D:术后 1 周 conbercept 0.5 mg 组 E:术后 1 周 conbercept 0.1 mg 组 F:术后 4 周单纯手术组 G:术后 4 周生理盐水组 H:术后 4 周 conbercept 0.5 mg 组 I:术后 4 周 conbercept 0.1 mg 组

表 2 各组兔眼术后不同时间点角膜中 TGF- β_1 表达的比较 (mean \pm SD)

组别	眼数	术后不同时间点 TGF- β_1 阳性细胞个数		术后不同时间点 TGF- β_1 平均 A 值	
		1 周	4 周	1 周	4 周
单纯手术组	8	23.3 \pm 4.2	35.4 \pm 2.4	0.1233 \pm 0.0074	0.1672 \pm 0.0072
生理盐水组	8	22.6 \pm 4.9	34.8 \pm 1.9	0.1217 \pm 0.0869	0.1689 \pm 0.0064
conbercept 0.5 mg 组	8	18.1 \pm 5.2 ^{ab}	29.9 \pm 2.0 ^{ab}	0.0828 \pm 0.0729 ^{ab}	0.1210 \pm 0.0054 ^{ab}
conbercept 0.1 mg 组	8	31.7 \pm 5.4 ^{abc}	46.1 \pm 2.1 ^{abc}	0.1745 \pm 0.0068 ^{abc}	0.2128 \pm 0.0064 ^{abc}

注:阳性细胞个数: $F_{组别} = 252.995, P = 0.000; F_{时间} = 1032.699, P = 0.000$. 平均 A 值: $F_{组别} = 2586.956, P = 0.000; F_{时间} = 3233.284, P = 0.000$. 与单纯手术组比较,^a $P < 0.05$;与生理盐水组比较,^b $P < 0.05$;与 conbercept 0.5 mg 组比较,^c $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD- t 检验) TGF:转化生长因子;conbercept:康柏西普

表 3 各组兔眼术后不同时间点角膜中 α -SMA 表达的比较 (mean \pm SD)

组别	眼数	术后不同时间点 α -SMA 阳性细胞个数		术后不同时间点 α -SMA 平均 A 值	
		1 周	4 周	1 周	4 周
单纯手术组	8	18.6 \pm 3.1	35.2 \pm 2.6	0.1224 \pm 0.0081	0.1695 \pm 0.0081
生理盐水组	8	19.8 \pm 4.0	34.3 \pm 3.1	0.1207 \pm 0.0089	0.1715 \pm 0.0083
conbercept 0.5 mg 组	8	12.3 \pm 3.6 ^{ab}	24.4 \pm 2.5 ^{ab}	0.0778 \pm 0.0066 ^{ab}	0.1219 \pm 0.0010 ^{ab}
conbercept 0.1 mg 组	8	23.9 \pm 3.3 ^{abc}	46.5 \pm 3.6 ^{abc}	0.1831 \pm 0.0080 ^{abc}	0.2337 \pm 0.0067 ^{abc}

注:阳性细胞个数: $F_{组别} = 317.699, P = 0.000; F_{时间} = 1802.580, P = 0.000$. 平均 A 值: $F_{组别} = 3107.335, P = 0.000; F_{时间} = 3632.182, P = 0.000$. 与单纯手术组比较,^a $P < 0.05$;与生理盐水组比较,^b $P < 0.05$;与 conbercept 0.5 mg 组比较,^c $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD- t 检验) SMA:平滑肌肌动蛋白;conbercept:康柏西普

表 4 各组兔术后不同时间点角膜中 MMP-2 表达的比较 (mean±SD)

组别	眼数	术后不同时间点 MMP-2 阳性细胞个数		术后不同时间点 MMP-2 平均 A 值	
		1 周	4 周	1 周	4 周
正常对照组	4	9.0±2.1	10.0±1.8	0.045 5±0.006 3	0.088 9±0.005 3
单纯手术组	8	26.5±2.1 ^a	35.5±1.9 ^a	0.115 2±0.006 2 ^a	0.147 7±0.005 0 ^a
生理盐水组	8	27.0±1.7 ^a	35.1±1.5 ^a	0.113 7±0.007 5 ^a	0.146 7±0.005 2 ^a
conbercept 0.5 mg 组	8	15.4±1.6 ^{abc}	25.4±2.0 ^{abc}	0.081 8±0.005 5 ^{abc}	0.120 8±0.005 3 ^{abc}
conbercept 0.1 mg 组	8	38.1±1.8 ^{abcd}	45.3±2.0 ^{abcd}	0.159 2±0.006 8 ^{abcd}	0.186 2±0.006 6 ^{abcd}

注:阳性细胞个数: $F_{组别} = 2.037.211, P = 0.000; F_{时间} = 1.268.354, P = 0.000$ 。平均 A 值: $F_{组别} = 2.536.402, P = 0.000; F_{时间} = 2.903.651, P = 0.000$ 。与正常对照组,^a $P < 0.05$;与单纯手术组比较,^b $P < 0.05$;与生理盐水组比较,^c $P < 0.05$;与 conbercept 0.5 mg 组比较,^d $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) MMP:基质金属蛋白酶; conbercept:康柏西普

3 讨论

Haze 的发生机制主要为术后角膜组织过度创伤愈合,角膜上皮增生,基质成纤维细胞活化增生产生排列紊乱的胶原纤维^[13]。角膜细胞可以转化为肌成纤维细胞, TGF- β_1 是其分化的关键调控因子^[14-19]。此外,肌成纤维细胞特征性地表达 α -SMA^[20-21], 导致胶原纤维排列紊乱。近年来发现 MMP-2 在 haze 形成中起关键作用, MMP-2 是 IV 型胶原酶, 能够降解基质主要骨架蛋白 IV 型胶原, 促使肌成纤维细胞的过度增生及胶原纤维的合成^[22-24]。目前有很多应用于减轻术后 haze 的药物, 术中应用抗代谢药物丝裂霉素 C 可有效破坏 DNA 的结构和功能, 抑制增生期 DAN 的复制, 阻止成纤维细胞增生, 抑制 TGF- β_1 、 α -SMA 及胶原物质产生, 防止瘢痕形成, 进而明显降低 haze 的发生率。术后抑制 haze 最主要、效果最佳的药物是糖皮质激素, 但干眼、激素性白内障及高眼压等并发症的存在限制了其应用。

VEGF 可增加血管通透性, 并可通过促进内皮细胞和基质细胞的增生形成新生血管, 目前抗 VEGF 药物在眼科临床中的应用广泛, 如角膜、虹膜、视网膜、脉络膜新生血管的抑制及黄斑水肿的治疗。既往研究发现, 抗 VEGF 药物通过改变胶原沉积及炎性细胞浸润, 减少伤口愈合纤维化, 显著抑制成纤维细胞介导的组织增生^[25-27]。此外, 在正常角膜上皮基底膜中有 VEGF 的表达, 适量 VEGF 对维持角膜的正常生理功能起一定作用^[28-29]。病理情况下, VEGF 分泌显著增多, bevacizumab 可通过抗 VEGF 作用加快角膜上皮基底膜形成, 抑制成纤维细胞增生, 减弱 TGF- β_1 和 α -SMA 的表达, 从而减少胶原的生成和堆积, 保持角膜

透明性。

Conbercept 为重组 VEGF 受体, 由人 VEGF 受体 1 中的免疫球蛋白样区域 2 和 VEGF 受体 2 中的免疫球蛋白样区域 3 和 4 与人免疫球蛋白 Fc 片段经过融合而成, 能特异性地结合抗 VEGF, 达到抑制内皮细胞及基质细胞增生和新生血管生长的作用。本研究结果显示, PRK 术后每日裂隙灯显微镜下观察 conbercept 0.1 mg 组 haze 最严重, conbercept 0.5 mg 组 haze 程度较其他手术组明显减轻, 术后 1 周和 4 周 TGF- β_1 、 α -SMA 和 MMP-2 的病理学变化与各组 haze 严重程度相一致, 说明结膜下注射适量 conbercept 可促进角膜上皮恢复, 抑制 TGF- β_1 和 MMP-2 的表达, 抑制成纤维细胞活化及基质中胶原纤维的破坏, 而结膜下注射过量 conbercept 则加重 haze 的形成。

正常情况下眼内 VEGF 水平处于一种动态平衡状态, 过度抗 VEGF 药物应用会影响正常眼组织血管的生成过程和视网膜的血液供应, 加重缺血、缺氧导致的神经细胞损伤^[30-31]。既往研究发现, 低剂量抗 VEGF 药物联合伊马替尼治疗可促进正常血管形成, 不产生细胞外基质沉积, 而大剂量抗 VEGF 药物联合伊马替尼治疗效果明显减弱。此外, 应用抗 VEGF 药物后可出现视网膜脱离、视网膜动脉阻塞、高眼压等并发症。研究表明, 抗 VEGF 治疗可使视网膜中 TGF- β 、结缔组织生长因子、睫状神经生长因子的表达升高, 导致视网膜组织纤维化^[32]。本实验中, 结膜下注射过量 conbercept 时, 机体需纠正抗 VEGF 导致的病理过程, 加重角膜组织的创伤。本研究结果表明, 结膜下注射 conbercept 对角膜屈光手术后 haze 的形成既有促进作用, 又有抑制的作用, 如能合理应用 conbercept 则能有效抑制 haze 的形成, 但人体应用最适剂量的选择仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Stulting RD, Carr JD, Thompson KP, et al. Complications of laser in situ keratomileusis for the correction of myopia [J]. Ophthalmology, 1999, 106(1): 13-20. DOI: 10.1016/S0161-6420(99)90000-3.
- [2] Blum M, Kunert KS, Voßmerbäumer U, et al. Femtosecond lenticule extraction (ReLEx) for correction of hyperopia-first results [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2013, 251(1): 349-355. DOI: 10.1007/s00417-012-2064-y.
- [3] Ivarsen A, Hjortdal J. Correction of myopic astigmatism with small incision lenticule extraction [J]. J Refract Surg, 2014, 30(4): 240-247. DOI: 10.3928/1081597X-20140320-02.
- [4] Aslanides IM, Kymionis GD. Trans advanced surface laser ablation (TransPRK) outcomes using SmartPulseTechnology [J]. Cont Lens Anterior Eye, 2017, 40(1): 42-46. DOI: 10.1016/j.clae.2016.11.004.
- [5] Aslanides IM, Georgoudis PN, Selimis VD, et al. Single-step transepithelial ASLA (SCHWIND) with mitomycin-C for the correction of high myopia: long term follow-up [J]. Clin Ophthalmol, 2015, 9:

- 33-41. DOI:10.2147/OPTH.S73424.
- [6] Aslanides IM, Selimis VD, Bessis NV, et al. A pharmacological modification of pain and epithelial healing in contemporary transepithelial all-surface laser ablation (ASLA) [J]. Clin Ophthalmol, 2015, 9 : 685-690. DOI:10.2147/OPTH.S81061.
- [7] Almosa AA, Fawzy SM. Effect of mitomycin C on myopic versus astigmatic photorefractive keratectomy [J/OL]. J Ophthalmol, 2017, 2017 : 2841408 [2018-01-10]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5368418/. DOI:10.1155/2017/2841408.
- [8] Teus MA, de Benito-Llopis L, Alió JL. Mitomycin C in corneal refractive surgery [J]. Surv Ophthalmol, 2009, 54 (4) : 487-502. DOI:10.1016/j.survophthal.2009.04.002.
- [9] 李婧, 沈政伟, 李德忠, 等. Bevacizumab 对兔去上皮瓣微型角膜刀法角膜上皮瓣下原位磨镶术后角膜上皮雾状混浊的影响 [J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31 (6) : 529-534. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.06.003.
Li J, Shen ZW, Li DZ, et al. Inhibition of tropical injected bevacizumab on haze formation after off-flap epipolipis laser in situ keratomileusis [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31 (6) : 529-534. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.06.003.
- [10] Lee KS, Ko DA, Kim ES, et al. Bevacizumab and rapamycin can decrease corneal opacity and apoptotic keratocyte number following photorefractive keratectomy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53 (12) : 7645-7653. DOI:10.1167/iovs.12-10494.
- [11] Fantes FE, Hanna KD, Waring GO 3rd, et al. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys [J]. Arch Ophthalmol, 1990, 108 (5) : 665-675.
- [12] O'Neill EC, Qin Q, Van Bergen NJ, et al. Antifibrotic activity of bevacizumab on human Tenon's fibroblasts *in vitro* [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51 (12) : 6524-6532. DOI:10.1167/iovs.10-5669.
- [13] Margo JA, Munir WM. Corneal haze following refractive surgery: a review of pathophysiology, incidence, prevention, and treatment [J]. Int Ophthalmol Clin, 2016, 56 (2) : 111-125. DOI:10.1097/HO.000000000000112.
- [14] Kaur H, Chaurasia SS, Agrawal V, et al. Corneal myofibroblast viability: opposing effects of IL-1 and TGF beta1 [J]. Exp Eye Res, 2009, 89 (2) : 152-158. DOI:10.1016/j.exer.2009.03.001.
- [15] Noh SM, Abdul Kadir SH, Crowston JG, et al. Effects of ranibizumab on TGF-β1 and TGF-β2 production by human Tenon's fibroblasts: an *in vitro* study [J]. Mol Vis, 2015, 21 : 1191-1200.
- [16] Blalock TD, Gibson DJ, Duncan MR, et al. A connective tissue growth factor signaling receptor in corneal fibroblasts [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53 (7) : 3387-3394. DOI:10.1167/iovs.12-9425.
- [17] Gibson DJ, Pi L, Sriram S, et al. Conditional knockout of CTGF affects corneal wound healing [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55 (4) : 2062-2070. DOI:10.1167/iovs.13-12735.
- [18] Karamichos D, Guo XQ, Hutcheon AE, et al. Human corneal fibrosis: an *in vitro* model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51 (3) : 1382-1388. DOI:10.1167/iovs.09-3860.
- [19] Jeon KI, Kulkarni A, Woeller CF, et al. Inhibitory effects of PPARγ ligands on TGF-β1-induced corneal myofibroblast transformation [J]. Am J Pathol, 2014, 184 (5) : 1429-1445. DOI:10.1016/j.ajpath.2014.01.026.
- [20] Kaur H, Chaurasia SS, Agrawal V, et al. Expression of PDGF receptor-alpha in corneal myofibroblasts *in situ* [J]. Exp Eye Res, 2009, 89 (3) : 432-434. DOI:10.1016/j.exer.2009.03.017.
- [21] Singh V, Torricelli AA, Nayeb-Hashemi N, et al. Mouse strain variation in SMA (+) myofibroblast development after corneal injury [J]. Exp Eye Res, 2013, 115 : 27-30. DOI:10.1016/j.exer.2013.06.006.
- [22] Tomás-Juan J, Murueta-Goyena LA, Hanneken L. Corneal regeneration after photorefractive keratectomy: a review [J]. J Optom, 2015, 8 (3) : 149-169. DOI:10.1016/j.optom.2014.09.001.
- [23] Corbett MC, O'Brart DP, Patmore AL, et al. Effect of collagenase inhibitors on corneal haze after PRK [J]. Exp Eye Res, 2001, 72 (3) : 253-259. DOI:10.1006/exer.2000.0959.
- [24] 陈玮志, 任泽钦, 董建强, 等. 多次大剂量贝伐单抗结膜下注射抗兔眼小梁切除术后瘢痕化研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29 (6) : 495-500. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.06.004.
Chen WZ, Ren ZQ, Dong JQ, et al. Anti-scar effect of bevacizumab by multiple-time and high-dose subconjunctival administration following trabeculectomy in rabbits [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29 (6) : 495-500. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.06.004.
- [25] Bloch W, Huggel K, Sasaki T, et al. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing [J]. FASEB J, 2000, 14 (15) : 2373-2376. DOI:10.1096/fj.00-0490fje.
- [26] Ko J, Ross J, Awad H, et al. The effects of ZD6474, an inhibitor of VEGF signaling, on cutaneous wound healing in mice [J]. J Surg Res, 2005, 129 (2) : 251-259. DOI:10.1016/j.j.issn.2005.05.006.
- [27] Schiffmann LM, Brunold M, Liwschitz M, et al. A combination of low-dose bevacizumab and imatinib enhances vascular normalisation without inducing extracellular matrix deposition [J]. Br J Cancer, 2017, 116 (5) : 600-608. DOI:10.1038/bjc.2017.13.
- [28] 武海军, 陆晓和, 钟彦彦, 等. 姜黄素对兔角膜新生血管模型中多形核白细胞计数和 VEGF 表达的影响 [J]. 眼科新进展, 2008, 28 (10) : 734-736.
Wu HJ, Lu XH, Zhong YY, et al. Curcumin on expression of VEGF and number of PMN in rabbit corneal neovascularization model [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2008, 28 (10) : 734-736.
- [29] Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, et al. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea [J]. Prog Retin Eye Res, 2000, 19 (1) : 113-129.
- [30] Zhang Z, Yang X, Jin H, et al. Changes in retinal nerve fiber layer thickness after multiple injections of novel VEGF decoy receptor conbercept for various retinal diseases [J/OL]. Sci Rep, 2016, 6 : 38326 [2017-06-13]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5138833/. DOI:10.1038/srep38326.
- [31] Shin HJ, Kim SN, Chung H, et al. Intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy and retinal nerve fiber layer loss in eyes with age-related macular degeneration: a meta-analysis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57 (4) : 1798-1806. DOI:10.1167/iovs.15-18404.
- [32] 黎晓新, 白玉婧. 抗血管内皮生长因子在眼科治疗中的趋势与挑战 [J]. 中华眼科杂志, 2016, 52 (5) : 321-324. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2016.05.001.
Li XX, Bai YJ. Progression and challenge of anti-vascular endothelial growth factor therapy in retinal neovascular disease [J]. Chin J Ophthalmol, 2016, 52 (5) : 321-324. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2016.05.001.

(收稿日期:2018-06-29 修回日期:2018-12-25)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊和中国中文核心期刊,月刊,80面,每月10日出版,每期定价16元,邮发代号:36-13,国内外公开发行人,欢迎到各地邮局或直接与本刊编辑部联系订阅。联系电话:0371-87160872。

(本刊编辑部)