

溴芬酸钠滴眼液对碱烧伤诱导大鼠角膜新生血管的抑制作用

高奕晨 路晓晓 张彩杰 牟芃玥 吕璵 褚晨晨 赵少贞

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 300384

通信作者:赵少贞,Email:zhaosz1997@sina.com

【摘要】 目的 探讨溴芬酸钠滴眼液对碱烧伤诱导的大鼠角膜新生血管(CNV)的抑制作用。方法 健康清洁级成年雄性 SD 大鼠 192 只,任意取 172 只大鼠通过碱烧伤法建立右眼 CNV 模型,按照随机数字表法分为 CNV 组、模型对照组、溴芬酸钠组和氟米龙组,每组 43 只大鼠 43 只眼,其余 20 只大鼠 40 只眼为正常对照组,不做任何处理。模型对照组、溴芬酸钠组和氟米龙组于造模后第 1 天分别给予 PBS、溴芬酸钠滴眼液及 0.1% 氟米龙滴眼液连续点眼 21 d。造模后每日裂隙灯显微镜下观察各组大鼠角膜、前房及 CNV 生长情况,并于造模后 1、3、7、14、21、28 d 行裂隙灯显微镜照相,计算 CNV 面积比率;于造模后 7、14、28 d 每组制作眼球石蜡切片,行苏木精-伊红染色及免疫组织化学染色,检测角膜中 CD45 及血管内皮生长因子(VEGF)-A 的表达;取实验眼角膜组织,采用实时荧光定量 PCR 法检测角膜组织中环氧合酶(COX)-2 及 VEGF mRNA 含量,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测角膜组织中 COX-2 及 VEGF 蛋白含量。结果 造模后 1 d,各模型组角膜水肿、混浊;造模后 7 d,角膜水肿持续加重;造模后 14 d,角膜混浊、水肿程度逐渐减轻;造模后 28 d,CNV 组、模型对照组有白斑形成,溴芬酸钠组和氟米龙组有角膜云翳。造模后 7、14、21、28 d,溴芬酸钠组和氟米龙组 CNV 面积比率均较 CNV 组和模型对照组低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);各时间点溴芬酸钠组与氟米龙组 CNV 面积比率比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。组织病理学染色及免疫组织化学染色显示,造模后 7 d,各模型组角膜上皮变薄,基质层水肿增厚,胶原纤维排列紊乱,VEGF-A 阳性表达;仅 CNV 组及模型对照组存在少量 CD45 阳性炎性细胞浸润。造模后 14 d、28 d,各组角膜上皮角化,基质水肿逐渐减轻,均未见炎性细胞浸润,CNV 组、模型对照组角膜中央可见 CNV。荧光定量 PCR 结果显示,造模后 7 d,CNV 组、模型对照组角膜 COX-2 及 VEGF mRNA 相对表达量均明显高于正常对照组、溴芬酸钠组和氟米龙组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。ELISA 检测结果显示,造模后 7 d、14 d,溴芬酸钠组 COX-2 及 VEGF 蛋白表达量明显低于 CNV 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。模型对照组和溴芬酸钠组角膜穿孔发生率均为 10% (1/10),氟米龙组角膜穿孔发生率达 30% (3/10),各造模组前房积血发生率为 10% ~ 30%。结论 溴芬酸钠滴眼液可抑制大鼠碱烧伤后 CNV 的形成与发展,这一作用可能是通过调节 COX-2 表达、减轻炎症反应和抑制 VEGF 产生介导的。

【关键词】 角膜新生血管; 碱烧伤; 溴芬酸钠; 环氧合酶-2

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.03.003

Inhibitory effect of bromfenac sodium hydrate ophthalmic solution on alkali burn induced-corneal neovascularization in rats

Gao Yichen, Lu Xiaoxiao, Zhang Caijie, Mu Pengyue, Lyu Ying, Chu Chenchen, Zhao Shaozhen

Tianjin Medical University Eye Hospital, School of Optometry and Ophthalmology of Tianjin Medical University, Tianjin Medical University Eye Institute, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Zhao Shaozhen, Email: zhaosz1997@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of bromfenac sodium hydrate ophthalmic solution on corneal neovascularization (CNV) induced by alkali burn. **Methods** A total of 192 specific pathogen free (SPF) degree adult male Sprague-Dawley (SD) rats were used in this study. One hundred and seventy-two rats were chosen to establish CNV model with alkali burn in the right eyes. Following alkali burn, rats were randomly divided into CNV group, model control group, bromfenac sodium group and fluorometholone group, with 43 rats (43 eyes) in each group. Another 20 rats (40 eyes) served as normal control group. One day after modeling, the model control group, bromfenac sodium group and fluorometholone group received phosphate buffer saline (PBS), bromfenac sodium hydrate ophthalmic solution and 0.1% fluorometholone eye drops, respectively. The state of cornea and anterior

chamber and the growth of CNV of rats in each group were observed by slit-lamp microscope every day after modeling. At 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days after modeling, the anterior segment photos of the experimental eyes were captured, and the percent of cornea areas covered by CNV was calculated. At 7, 14 and 28 days after modeling, the eye tissue sections were stained with hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry staining to evaluate the expressions of CD45 and VEGF-A. Real-time quantitative PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the expression of COX-2 and VEGF mRNA and protein level. The use and care of the animals complied with the Statement of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). **Results** Each model group showed corneal edema and opacification 1 day after modeling. The corneal edema was aggravated 7 days after modeling. On the 14th day after modeling, the degree of corneal opacity and edema decreased gradually. On the 28th day after modeling, leucoma was observed in CNV group and model control group, and nebula was observed in bromfenac sodium group and fluorometholone group. At 7, 14, 21 and 28 days after modeling, the percentages of CNV areas in bromfenac sodium group and fluorometholone group were significantly lower than those in CNV group and model control group (all at $P < 0.05$). No significant difference was found in the percentage of CNV areas between bromfenac sodium group and fluorometholone group at various time points (all at $P > 0.05$). On the 7th day after modeling, the thinning of corneal epithelial layer, edema and arrangement disorder of stroma layer were observed, and the expression of VEGF-A was positive in all model groups; a small amount of CD45 positive inflammatory cell infiltrations were observed in CNV group and model control group. On the 14th and 28th day after modeling, CNV was seen in the center of cornea in CNV group and model control group; the epithelial keratosis and reduction of corneal edema were seen in each group, and no inflammatory cell infiltration was observed in each group. On the 7th day after modeling, the expressions of COX-2 and VEGF mRNA in CNV group and model control group were significantly higher than those in normal control group, bromfenac sodium group and fluorometholone group (all at $P < 0.05$), the expressions of COX-2 and VEGF protein in bromfenac sodium group were significantly lower than those in CNV group (all at $P < 0.05$). The corneal perforation rate in model control group and bromfenac sodium group was 10% (1 case in 10 rats). The corneal perforation rate in fluorometholone group was 30% (3 cases in 10 rats). In each model group, 10% to 30% rats had hyphema. **Conclusions** Bromfenac sodium hydrate ophthalmic solution can inhibit the formation and growth of CNV after alkali burn in rats. This effect may be mediated by regulating COX-2 expression, reducing inflammation and inhibiting VEGF production.

[Key words] Corneal neovascularization; Alkali burn; Bromfenac sodium; Cyclooxygenase-2

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.03.003

角膜是眼部重要的屈光介质之一,促血管生成因子与抗血管生成因子之间的动态平衡是维持正常角膜无血管特性、角膜透明性及正常视力的关键因素^[1]。感染、炎症、创伤和局部缺血缺氧等可导致该平衡被破坏,新生毛细血管从角膜缘长出并侵入角膜,形成角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)。CNV可诱发持续性炎症、水肿及瘢痕,破坏角膜透明度,导致患者视力下降,甚至丧失,其也是角膜移植术后发生免疫排斥反应的高危因素^[2-3]。CNV作为一种常见的眼部病变,其发病机制和治疗一直是国内外眼科学者研究的热点。研究发现,炎症在角膜的新生血管化过程中起着至关重要的作用^[4-5],其中环氧合酶(cyclooxygenase, COX)前列腺素系统参与炎症反应的同时也可调节血管生成^[6]。如何减少CNV的形成是治疗多种角膜疾病的一个关键问题。目前,针对CNV的抗炎药物主要包括糖皮质激素和非甾体类抗炎药,而局部使用糖皮质激素可导致角膜伤口愈合延缓、白内障形成、眼压升高,并增加感染的风险^[7]。新一代

非甾体类抗炎药溴芬酸钠是一类强效COX-2抑制剂,其通过抑制COX-2分泌减少前列腺素合成以达到抗炎作用^[8]。研究发现,溴芬酸钠局部应用效果较好,不良反应少,并可抑制激光诱导的脉络膜新生血管生成^[9],但其能否抑制CNV尚不清楚。本研究中拟采用溴芬酸钠滴眼液与0.1%氟米龙滴眼液分别治疗碱烧伤诱导的大鼠CNV,评估应用溴芬酸钠滴眼液对碱烧伤后CNV的抑制作用,并对其机制进行探究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 健康清洁级成年雄性SD大鼠192只(购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物质量合格证号:11400700271429),体质量220~240g,实验前采用裂隙灯显微镜检查排除大鼠眼部病变。实验动物饲养于天津医科大学眼科研究所动物实验室,动物饲养房温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度为50%~75%,12h光照昼夜循环,通风状况良好。实验

动物的喂养和使用遵循视觉与眼科学研究协会 (the Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO) 的管理规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 溴芬酸钠滴眼液 (规格: 5 ml:5 mg, 药品注册证号: H20150243) (日本千寿制药株式会社)、质量分数 0.1% 氟米龙滴眼液 (规格: 5 ml:5 mg, 药品注册证号: H20130111) (日本参天制药株式会社); 兔 VEGF-A 多克隆抗体 (1:1 000, 北京博奥森生物技术有限公司); 组织蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司); 大鼠 VEGF ELISA 试剂盒 (深圳欣博盛生物科技有限公司); 大鼠 COX-2 ELISA 试剂盒、兔抗大鼠 CD45 多克隆抗体 (1:400) (武汉华美生物工程有限公司); 逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司); 荧光定量 PCR 引物 (北京赛百盛基因技术有限公司); Fast SYBR[®] Green Master Mix (美国 Roche 公司); 氢氧化钠 (天津市科密欧化学试剂有限公司)。裂隙灯显微镜 (重庆康华科技有限公司); 手术显微镜 (日本 OPTON 公司); BX51 光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); 酶标仪 (瑞士 Tecon 公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 建立碱烧伤诱导的大鼠 CNV 模型 任意选取 172 只大鼠进行造模, 术前禁食 4 h, 称质量后按照 3 ml/kg 给予质量分数 10% 水合氯醛注射液腹腔内注射麻醉, 复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳, 术前 10 min 盐酸奥布卡因滴眼液局部点眼麻醉 3 次, 安尔碘消毒, 无菌棉签拭去多余水分; 将浸润在 1 mol/L 氢氧化钠溶液中 20 s、直径为 3.5 mm 的滤纸片置于干燥滤纸上 1 s 以去除多余的碱液, 再置于 SD 大鼠右眼角膜中央烧灼 45 s 后取下滤纸, 立即用无菌生理盐水充分冲洗大鼠角膜及结膜囊 1 min; 左眼不作任何处理。其余 20 只大鼠作为正常对照大鼠, 不作处理, 常规饲养。

1.2.2 实验分组及给药 将 172 只造模 SD 大鼠按随机数字表法分为 CNV 组、模型对照组、溴芬酸钠组和氟米龙组, 均以右眼为实验眼, 每组 43 只大鼠 43 只眼, 其余 20 只大鼠 40 只眼为正常对照组。CNV 组造模后不作任何处理, 正常饲养; 模型对照组、溴芬酸钠组和氟米龙组造模后第 1 天分别给予 PBS、溴芬酸钠滴眼液和 0.1% 氟米龙滴眼液点眼, 每天 4 次, 每次 10 μ l, 连续点眼 21 d 后停药观察 1 周。正常对照组不作任何处理。

1.2.3 裂隙灯显微镜检查 造模后每日在裂隙灯显微镜下观察各组大鼠角膜、前房及 CNV 情况, 分别于

造模后第 1、3、7、14、21、28 天行裂隙灯显微镜照相, 计算 CNV 面积与整个角膜面积的比值, 面积计算公式: $S=C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r-l)^2]$, 其中 S 为面积, C 为 CNV 区域占角膜周长的钟点数, r 是角膜半径, l 为新生血管长度 (以从角膜缘侵入的朝向受损角膜中心生长且连续弯曲度小的最长新生血管为准), 半径和 CNV 区域用图像分析软件 (Image-Pro Plus 6.0, IPP 6.0) 来测量。

1.2.4 组织病理学染色及 CD45 和 VEGF-A 免疫组织化学染色 于造模后 7、14、28 d, 在裂隙灯显微镜下观察后, 各组任意过量麻醉法处死大鼠 3 只, 迅速摘除眼球置于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 平行于眼轴方向连续切片, 切片厚度为 3 μ m, 行常规苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察组织结构。各组取石蜡切片常规脱蜡至水, 微波加热进行抗原修复 20 min, 体积分数 3% 过氧化氢去离子水孵育 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min; 滴加山羊血清封闭 15 min, 滴加 CD45 及 VEGF-A 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min, 滴加生物素标记山羊抗兔 IgG, 室温孵育 15 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min; 常规 DAB 显色, 充分冲洗, 苏木素复染核, 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 CD45 和 VEGF-A 表达情况, 并拍照。

1.2.5 荧光定量 PCR 法检测角膜组织中 COX-2 及 VEGF mRNA 相对表达量 造模后 7、14、28 d, 各造模组任取 4 只大鼠, 正常对照组取 2 只大鼠, 过量麻醉法处死后, 剪下带 1 mm 巩膜环的角膜, 迅速置于无 RNA 酶的 EP 管中, 液氮速冻后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。提取组织 RNA 后逆转录合成 cDNA 模板, 行荧光定量 PCR 检测, 扩增体系为 10 μ l。扩增程序为 50 $^{\circ}$ C 孵育 2 min, 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火和延伸 1 min, 共 40 个循环。目的基因引物设计: COX-2 上游引物为 5'-TGACAGCCCACTTACA-3', 下游引物为 5'-CCGGATGAAGTCTCTCCTC-3'; VEGF 上游引物为 5'-GTGACTGACCTGCTTTTGGG-3', 下游引物为 5'-AAAGTTCCGTGCAATCCCG-3'。 β -actin 上游引物为 5'-TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA-3', 下游引物为 5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'。以 β -actin 为内参照, 根据公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各目的基因的相对表达量。

1.2.6 酶联免疫吸附试验检测角膜组织中 COX-2 和 VEGF 蛋白含量 造模后第 7、14、28 天, 各组任取 4 只大鼠, 正常对照组取 2 只大鼠, 过量麻醉法处死后, 剪下带 1 mm 巩膜环的角膜, 迅速置于 EP 管中, 液氮中

速冻后置于-80℃冰箱保存待用。根据组织蛋白抽提试剂盒说明书步骤提取角膜组织总蛋白,BCA法检测总蛋白浓度,根据ELISA试剂盒说明书步骤检测角膜总蛋白中COX-2及VEGF蛋白浓度。计算单位总蛋白中COX-2及VEGF的蛋白含量,即COX-2或VEGF蛋白浓度与对应样本的总蛋白浓度的比值。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0统计学软件(美国IBM SPSS公司)进行统计分析。本研究中各检测指标的计量资料经W检验符合正态分布,以mean±SD表示。各组不同时间点CNV面积比率、COX-2及VEGF mRNA和蛋白表达总体比较采用两因素方差分析,组间多重比较采用Tukey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠角膜碱烧伤后裂隙灯显微镜观察

正常对照组大鼠角膜透明、表面光滑,可见虹膜血管,瞳孔呈细针孔状(图1A)。造模后第1天,各造模组角膜均轻度水肿、混浊,角膜中央烧灼区可见灰白色、半透明、3.0~3.5 mm直径的烧灼斑(图1B)。造模后3 d,各造模组角膜中度混浊、水肿,CNV组、模型对照组部分虹膜窥不清,仅可见瞳孔缘,溴芬酸钠组和氟米龙组虹膜血管及瞳孔仍可见;造模后7 d,CNV组、模型对照组角膜重度混浊、水肿,前房不可见,溴芬酸钠组、氟米龙组大部分角膜混浊、水肿轻度加重,可见瞳孔缘;造模后14 d,各组角膜混浊、水肿均逐渐减轻;造模后28 d,各组角膜混浊、水肿程度继续减轻,CNV组、模型对照组有角膜白斑形成,溴芬酸钠组和氟米龙组遗留角膜云翳(图2)。

2.2 造模后不同时间点各组大鼠CNV生长情况

造模后1 d,各组角膜缘血管扩张充血,均可见极少量细小新生血管长入角膜缘。造模后3 d,各组CNV呈毛刷状包绕角膜缘,血管细短,长度不足角膜半径的1/2;造模后7 d,CNV组、模型对照组CNV围绕角膜缘呈致密的栅栏状延伸至角膜中周部,长度接近1/2角膜半径,溴芬酸钠组、氟米龙组CNV向角膜中央部延伸至小于1/2角膜半径,血管较稀疏;造模后14 d,各组CNV继续向角膜中央延伸,CNV组、模型对照组CNV快速生长至角膜中央部,血管粗乱,溴芬酸钠组、氟米龙组CNV在角膜中周部略有增长,此时溴芬酸钠

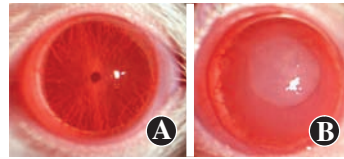


图1 造模后1 d各组大鼠角膜情况
A:正常对照组角膜透明、表面光滑 B: CNV组角膜轻度水肿混浊,可见半透明烧灼斑

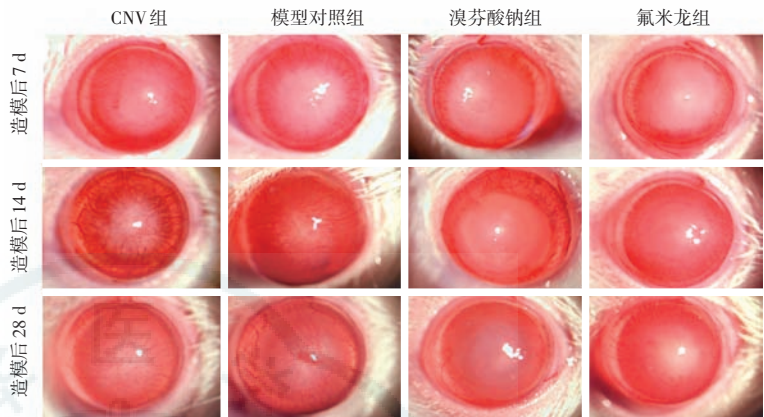


图2 造模后第7、14、28天各造模组大鼠角膜情况 造模后7 d,CNV组、模型对照组角膜重度混浊水肿,前房不可见;溴芬酸钠组、氟米龙组角膜中度混浊,可见瞳孔缘;造模后14 d,CNV组、模型对照组、溴芬酸钠组和氟米龙组角膜混浊水肿度均减轻;造模后28 d,CNV组和模型对照组形成角膜白斑,溴芬酸钠组和氟米龙组遗留角膜斑云翳

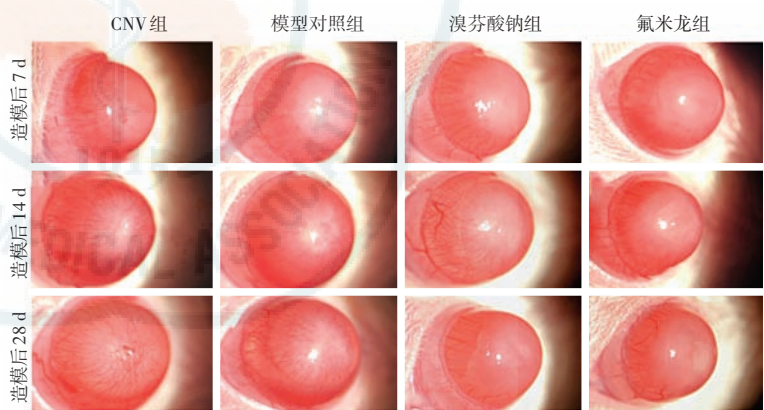


图3 造模后7、14、28 d各组大鼠CNV生长情况 造模后7 d,CNV组、模型对照组CNV均包绕角膜缘,呈致密的栅栏状延伸至角膜中周部;溴芬酸钠组、氟米龙组CNV较稀疏,血管较细,生长至不到1/2角膜半径;造模后14 d,CNV组、模型对照组CNV生长至角膜中央部,血管粗乱;溴芬酸钠组、氟米龙组CNV生长至角膜中周部,较稀疏;造模后28 d,CNV组、模型对照组、溴芬酸钠组和氟米龙组CNV均变细减退,但CNV组、模型对照组仍存留无法消退的中周部CNV

组、氟米龙组CNV面积比率达最大值;造模后21 d,CNV组和模型对照组CNV略向角膜中央生长,各组CNV均逐渐变细;造模后28 d,各组CNV均变细、减退,但CNV组和模型对照组仍存留无法消退的中周部CNV(图3)。不同时间点各组CNV面积比率总体比较,差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 117.403, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 278.760, P = 0.000$)。造模后7、14、21、28 d,溴芬酸钠组和氟米龙组CNV面积比率均较CNV组和模型对照组低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);各时间点溴芬酸钠组与氟米龙组CNV面积比率比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表1)。

表 1 各组大鼠碱烧伤后不同时间点 CNV 面积比率比较 (mean±SD)

组别	样本量	造模后不同时间点 CNV 面积比率					
		1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
CNV 组	10	0.038±0.023	0.181±0.024	0.594±0.081	0.839±0.133	0.887±0.168	0.723±0.247
模型对照组	10	0.040±0.013	0.192±0.039	0.465±0.061 ^a	0.773±0.091	0.829±0.132	0.797±0.101
溴芬酸钠组	10	0.039±0.014	0.159±0.038	0.359±0.086 ^a	0.480±0.119 ^{ab}	0.403±0.039 ^{ab}	0.388±0.091 ^{ab}
氟米龙组	10	0.049±0.028	0.150±0.045	0.334±0.077 ^{ab}	0.420±0.070 ^{ab}	0.402±0.135 ^{ab}	0.402±0.072 ^{ab}

注: $F_{\text{分组}} = 117.403, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 278.760, P = 0.000$. 与各自时间点 CNV 组比较, ^a $P < 0.05$; 与各自时间点模型对照组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) CNV: 角膜新生血管

2.3 造模后不同时间点各组角膜组织病理学变化及 CD45、VEGF-A 表达分布

组织病理学染色结果显示, 正常大鼠角膜表面光滑, 上皮层由 4~6 层细胞构成, 细胞间紧密相连, 上皮层厚度均一, 基质层排列规则, 纤维连接致密 (图 4)。造模后 7 d, 各组角膜上皮细胞层数减少, 呈大泡状病变, 排列不规则, 基质层水肿增厚, 基质纤维皱缩, 间隙增大, 排列紊乱, CNV 组、模型对照组角膜基质层可见少量 CNV 长入, 溴芬酸钠组、氟米龙组基质层较 CNV

组、模型对照组平整, 排布较规律; 造模后 14 d, 各组角膜上皮由 2~3 层细胞覆盖, 上皮角化增厚, 基质水肿减轻, 基质排列相对整齐, CNV 组、模型对照组角膜中央基质内可见大量 CNV; 造模后 28 d, 各组角膜上皮愈合, 胶原纤维排列较整齐, CNV 组和模型对照组仍有少量未消退的 CNV (图 5)。免疫组织化学染色显示, 仅在造模后 7 d, CNV 组及模型对照组存在轻微炎性细胞浸润, 可见极少量 CD45 阳性细胞, 其余时间各组均未见炎性细胞浸润 (图 6)。造模后 7 d, 各组角膜基质层均 VEGF-A 表达阳性, CNV 组和模型对照组 VEGF-A 染色强度强于溴芬酸钠组和氟米龙组; 造模后 14 d, 各组角膜基质层 VEGF-A 染色程度相同, 均较造模后 7 d 减弱, 角膜上皮层均出现 VEGF-A 弱阳性表达; 造模后 28 d, 除氟米龙组角膜上皮仍存在 VEGF-A 弱阳性表达外, 其余各组均未见 VEGF-A 阳性表达 (图 7)。



图 4 正常对照组角膜组织病理学染色 (HE ×200, 标尺 = 50 μm) 角膜表面光滑, 上皮细胞间紧密连接, 基质层排列规则

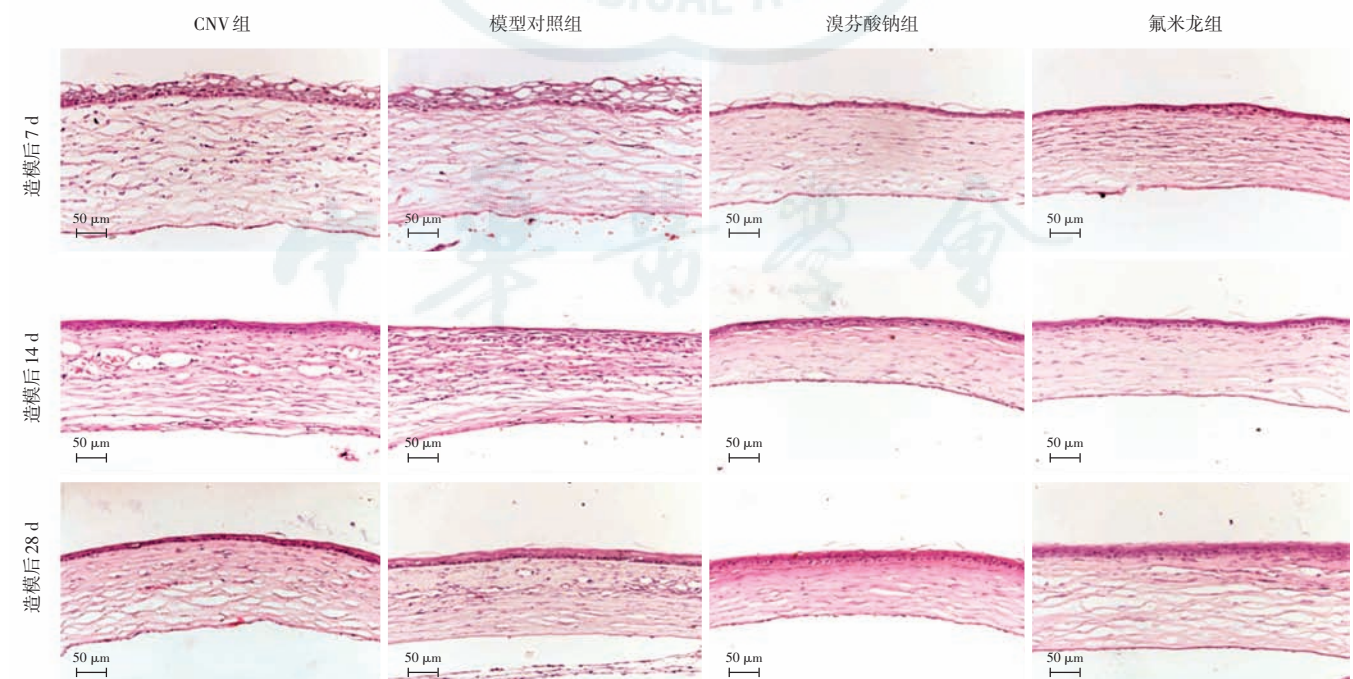


图 5 造模后 7、14、28 d 各模型组大鼠角膜中央烧灼区组织病理学染色 (HE ×200, 标尺 = 50 μm) 造模后 7 d, CNV 组和模型对照组基质层水肿增厚, 基质纤维皱缩, 间隙增大, 排列紊乱, 可见少量 CNV, 溴芬酸钠组和氟米龙组角膜上皮细胞层数减少, 胶原纤维排列不规则; 造模后 14 d, CNV 组和模型对照组角膜基质水肿减轻, 中央区可见 CNV, 溴芬酸钠组和氟米龙组角膜上皮由 2~3 层细胞覆盖, 上皮角化增厚, 未见中央区 CNV; 造模后 28 d, CNV 组、模型对照组、溴芬酸钠组和氟米龙组角膜上皮均愈合, 角膜基质水肿消退, 胶原纤维排列较整齐

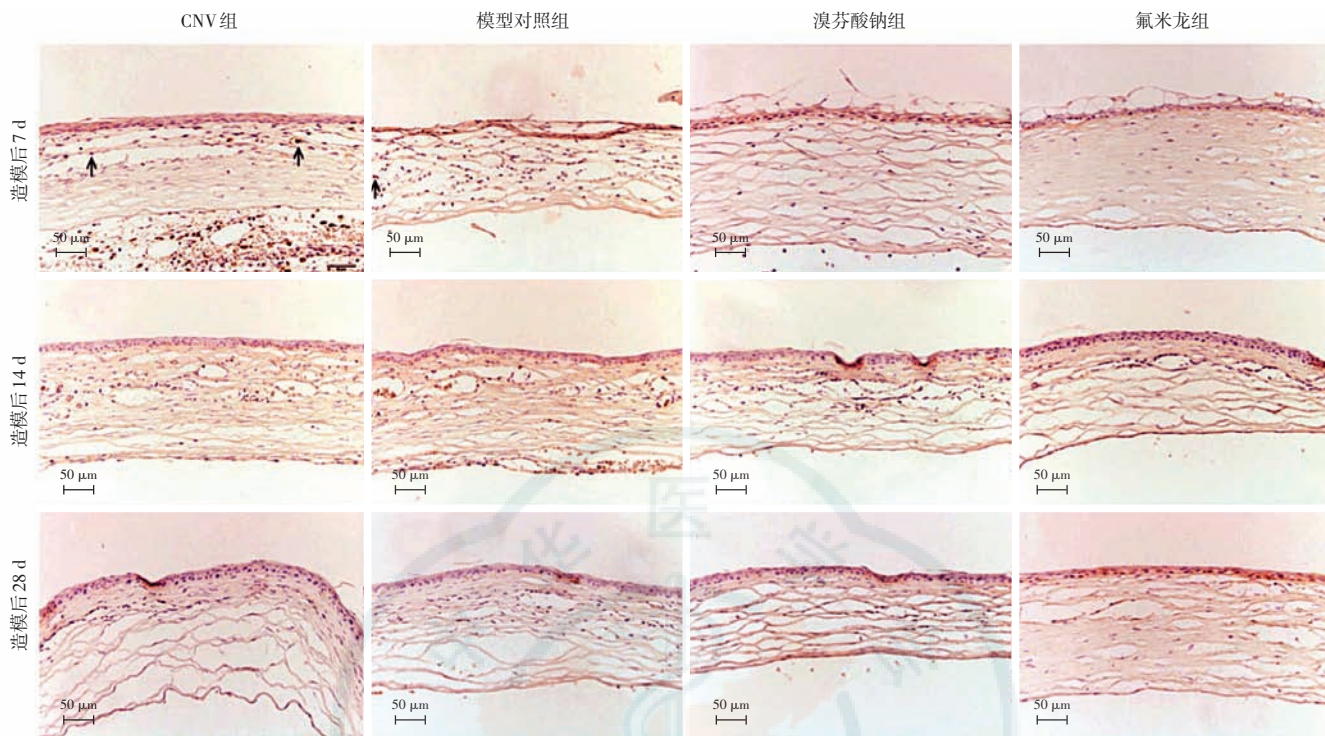


图 6 造模后 7、14、28 d 各模型组大鼠角膜中央烧灼区 CD45 表达情况 (DAB ×200, 标尺 = 50 μm) 造模后 7 d, CNV 组和模型对照组角膜基质层可见极少量 CD45 阳性细胞 (箭头), 溴芬酸钠组和氟米龙组未见炎症细胞浸润; 造模后 14 d、28 d, 各组均未见炎症细胞浸润

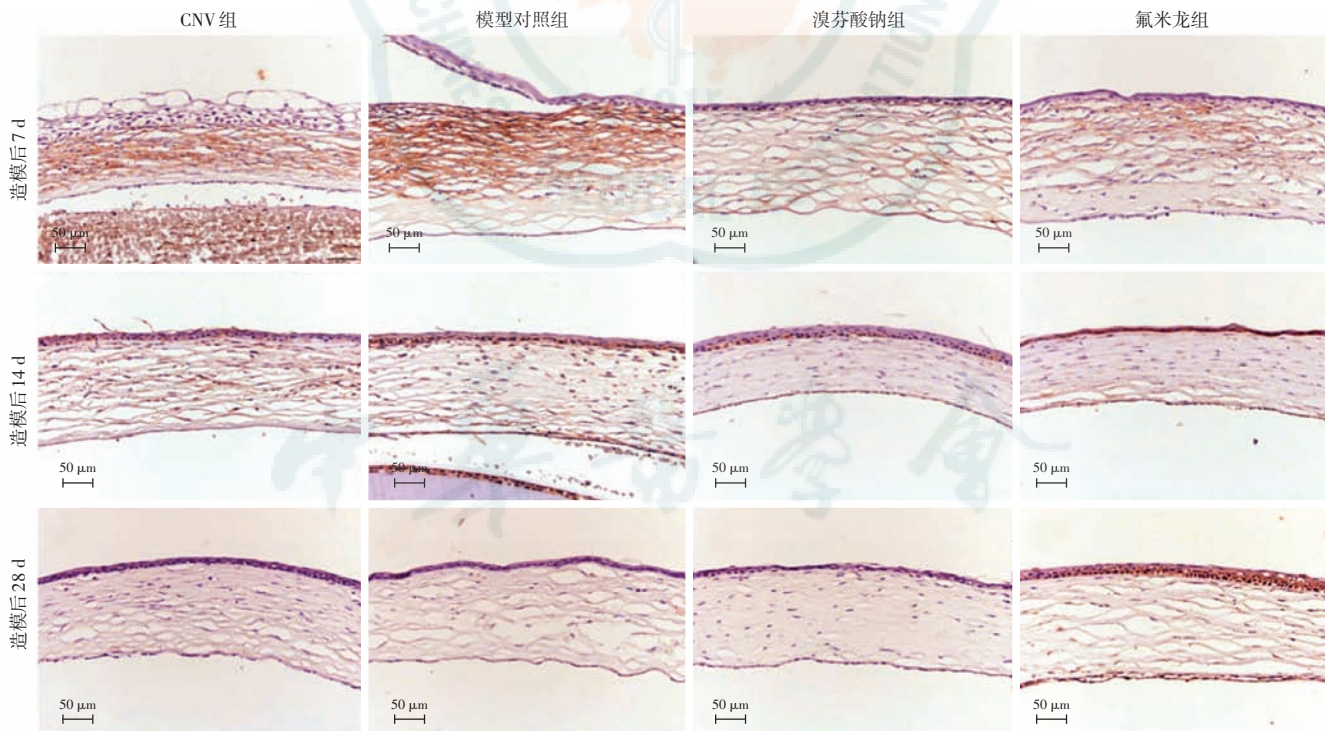


图 7 造模后 7、14、28 d 各模型组大鼠角膜中央烧灼区 VEGF-A 表达情况 (DAB ×200, 标尺 = 50 μm) 造模后 7 d, CNV 组和模型对照组角膜基质层 VEGF-A 呈强阳性表达, 溴芬酸钠组和氟米龙组角膜基质层 VEGF-A 呈弱阳性表达; 造模后 14 d, CNV 组、模型对照组、溴芬酸钠组和氟米龙组角膜基质层 VEGF-A 染色强度减弱, 角膜上皮层出现 VEGF-A 阳性表达; 造模后 28 d, CNV 组、模型对照组、溴芬酸钠组角膜各层均未发现 VEGF-A 阳性表达, 氟米龙组角膜上皮 VEGF-A 呈弱阳性表达

2.4 各组不同时间点角膜组织中 COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA 的表达

各组不同时间点 COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA

相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 (COX-2: $F_{\text{分组}} = 12.839, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 3.563, P = 0.037.$ VEGF: $F_{\text{分组}} = 10.791, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 7.306, P =$

0.002)。造模后7 d,CNV 组、模型对照组 COX-2 mRNA 及 VEGF mRNA 相对表达量均高于正常对照组、溴芬酸钠组及氟米龙组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);造模后14 d,CNV 组和模型对照组 COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA 相对表达量较造模后7 d略有下降,而溴芬酸钠组、氟米龙组略有上升,但差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);造模后28 d,各组间 COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA 相对表达量比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表2)。

2.5 角膜组织中 COX-2 及 VEGF 蛋白表达比较

各组不同时间点角膜 COX-2 及 VEGF 蛋白表达量总体比较,差异均有统计学意义(COX-2: $F_{\text{分组}} = 64.922, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 27.949, P = 0.000$. VEGF: $F_{\text{分组}} = 30.595, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 25.677, P = 0.000$)。

正常角膜 COX-2 及 VEGF 蛋白均微量表达或不表达,造模后7、14、28 d,各造模组 COX-2 蛋白表达量均高于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);造模后7 d和14 d,各造模组 VEGF 蛋白表达量均高于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。造模后7 d,CNV 组和模型对照组 COX-2 及 VEGF 蛋白表达量达到最大值,且明显高于溴芬酸钠组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);造模后14 d,CNV 组与溴芬酸钠组 COX-2 及 VEGF 蛋白表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),其余造模组间 COX-2 及 VEGF 蛋白表达比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);造模后28 d,各造模组间 COX-2 及 VEGF 蛋白表达比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表3)。

表2 各组大鼠造模后不同时间点 COX-2 及 VEGF mRNA 相对表达量比较(mean±SD)

组别	样本量	造模后不同时间点 COX-2 mRNA 相对表达量			造模后不同时间点 VEGF mRNA 相对表达量		
		7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
正常对照组	4	0.828±0.053	0.839±0.080	0.860±0.076	0.707±0.191	0.839±0.094	0.690±0.179
CNV 组	4	9.560±3.960 ^a	5.085±3.479	3.414±2.221	4.796±2.199 ^a	2.927±0.868	1.815±1.625
模型对照组	4	9.485±4.425 ^a	4.843±0.937	4.121±2.417	7.932±4.678 ^a	3.654±1.096	1.651±0.615
溴芬酸钠组	4	2.351±0.795 ^{bc}	2.056±0.746	2.229±1.192	1.368±0.312 ^{bc}	2.179±0.752	1.065±0.459
氟米龙组	4	2.248±0.567 ^{bc}	4.261±1.062	4.970±3.609 ^a	0.856±0.119 ^{bc}	3.201±1.126	1.368±1.180

注:COX-2: $F_{\text{分组}} = 12.839, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 3.563, P = 0.037$. VEGF: $F_{\text{分组}} = 10.791, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 7.306, P = 0.002$. 与各自时间点正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自时间点 CNV 组比较,^b $P < 0.05$;与各自时间点模型对照组比较,^c $P < 0.05$ (两因素方差分析,Tukey 检验) COX:环氧化酶;VEGF:血管内皮生长因子;CNV:角膜新生血管

表3 各组大鼠造模后不同时间点 COX-2 及 VEGF 蛋白表达比较(mean±SD)

组别	样本量	造模后不同时间点 COX-2 蛋白表达结果			造模后不同时间点 VEGF 蛋白表达结果		
		7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
正常对照组	4	14.612±7.567	14.246±5.644	21.495±10.389	1.503±0.432	1.903±0.303	1.869±0.156
CNV 组	4	86.166±6.015 ^a	80.646±7.432 ^a	52.568±8.499 ^a	32.304±8.375 ^a	29.709±9.983 ^a	8.821±7.964 ^a
模型对照组	4	93.849±7.989 ^a	72.461±6.489 ^a	48.651±11.225 ^a	29.290±6.404 ^a	24.662±4.068 ^a	12.205±3.467 ^a
溴芬酸钠组	4	64.842±4.987 ^{abc}	58.599±8.232 ^{ab}	43.141±19.907 ^a	13.531±3.526 ^{abc}	17.635±1.164 ^{ab}	7.771±3.267 ^a
氟米龙组	4	74.860±6.222 ^a	77.629±4.883 ^a	52.776±19.950 ^a	14.931±2.184 ^{abc}	18.450±1.797 ^a	7.642±0.892 ^a

注:COX-2: $F_{\text{分组}} = 64.922, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 27.949, P = 0.000$. VEGF: $F_{\text{分组}} = 30.595, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 25.677, P = 0.000$. 与各自时间点正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自时间点 CNV 组比较,^b $P < 0.05$;与各自时间点模型对照组比较,^c $P < 0.05$ (两因素方差分析,Tukey 检验) COX:环氧化酶;VEGF:血管内皮生长因子;CNV:角膜新生血管

2.6 其他并发症

造模后28 d,CNV 组均未见角膜穿孔,前房积血发生率为20%(2/10);模型对照组角膜穿孔发生率为10%(1/10),前房积血发生率为20%(2/10);溴芬酸钠组角膜穿孔发生率为10%(1/10),前房积血发生率为30%(3/10);氟米龙组角膜穿孔发生率达30%(3/10),前房积血发生率为10%(1/10)。

3 讨论

据估计,每年约有140万人发生CNV,其中12%

的患者最终丧失视力^[2]。眼部烧伤患者在眼外伤急诊中约占18%,其中超过80%的角膜烧伤是由化学试剂引起的^[10]。在美国,每年由染料、酸、碱等化学试剂引起的新生血管化眼病患者约有37 000例^[11],其中碱性物质可导致角膜上皮缺损、溃疡、CNV 及角膜瘢痕形成等严重的眼部损伤。由于角膜碱烧伤比酸损伤更常见,因此,近年来 CNV 的研究多聚焦于碱烧伤模型^[12-13]。应用碱性试剂氢氧化钠溶液对大鼠角膜中央进行烧灼,模拟碱烧伤后 CNV 模型,具有操作简单、成熟、接近临床的特点^[14]。故本研究中采用碱烧伤模

型来研究溴芬酸钠对 CNV 的抑制效果。

角膜碱烧伤后,需及时抑制眼部炎症及 CNV 形成,促进角膜上皮愈合,并在炎症反应期应用抗炎药物来修复角膜的透明度,同时降低基质溶解及角膜穿孔的发生率^[15-16]。迄今为止,糖皮质激素、非甾体类抗炎药、光动力疗法和抗 VEGF 类药物均已被证实能有效抑制 CNV 生长,但均存在一定的不良反应^[17],最终可能仍需羊膜移植,甚至角膜移植手术治疗解决。

溴芬酸钠是 COX-2 抑制剂类非甾体类抗炎药,具有显著抗炎作用,由于其起效快、穿透性强,已应用于黄斑水肿、脉络膜新生血管等疾病的临床及基础研究^[9,18-19]。郭桂玉等^[20]应用溴芬酸钠原料药与壳聚糖结合制成纳米粒并胶联羊膜,作用于碱烧伤诱导的兔角膜发现,其可明显抑制 CNV。由于以往研究已发现羊膜以及壳聚糖治疗碱烧伤角膜均可起到一定修复及抑制 CNV 形成的作用^[21-22],所以无法验证单独应用溴芬酸钠是否对碱烧伤角膜以及 CNV 起作用。同时,曲明俐等^[23]对比 3 种常用非甾体类抗炎药滴眼液发现,溴芬酸钠滴眼液对角膜上皮细胞的毒性作用较双氯芬酸钠滴眼液及普拉洛芬滴眼液小,临床应用较为安全。因此,本研究中选用市面成品药物溴芬酸钠滴眼液,并与临床常用 0.1% 氟米龙滴眼液作用于大鼠碱烧伤角膜进行对比研究,进一步比较其作用效果及安全性。

本研究显示大鼠角膜碱烧伤后应用溴芬酸钠滴眼液可显著改善角膜混浊、水肿情况和角膜上皮的异常结构,降低 COX-2 及 VEGF 蛋白和基因的表达,抑制 CNV 生长。造模后 7 d 内,CNV 组、模型对照组角膜混浊、水肿程度明显重于溴芬酸钠组和氟米龙组,提示溴芬酸钠滴眼液及 0.1% 氟米龙滴眼液在角膜碱烧伤后早期均可起到抑制炎症的作用。免疫组织化学染色结果显示,仅在造模后 7 d 时 CNV 组和模型对照组存在轻微炎性细胞浸润情况,推测炎症反应期为造模后 3 d,至造模后 7 d,炎症反应已开始逐渐减退。造模后 1 d,各组角膜缘均可见细小 CNV,与 Han 等^[24]研究一致;造模后 14 d 为 CNV 的生长期^[25],CNV 组、模型对照组于该阶段 CNV 迅速生长,并于造模后 21 d 开始消退;溴芬酸钠组和氟米龙组 CNV 在造模后 14 d 生长受到明显抑制,提示溴芬酸钠滴眼液与 0.1% 氟米龙滴眼液对碱烧伤后早期 CNV 可起到等效的抑制作用。模型对照组 CNV 面积比率于造模后 7 d 低于 CNV 组,分析其可能原因为碱烧伤后应用缓冲液冲洗角膜达到一定的缓解作用^[26]。

既往研究发现,炎症是 CNV 发生和发展的重要因

素^[4]。在角膜炎症和 CNV 中存在 COX-2 及 VEGF 的高表达,COX-2 的过度表达和其介导的前列腺素的产生会刺激血管生成,促进细胞的迁移和入侵,同时 VEGF 可促进血管内皮细胞增生、迁移,COX-2 可通过与 VEGF 通路的相互作用来调节血管生成^[6,27]。Wang 等^[28]及 Kim 等^[29]同样应用大鼠角膜碱烧伤模型进行研究发现,碱烧伤后 CNV 长出伴有 COX-2 及 VEGF 表达升高。本研究结果表明,在造模后 7 d,CNV 组和模型对照组中 COX-2 和 VEGF mRNA 及蛋白表达明显高于正常对照组。作为 COX-2 抑制剂,溴芬酸钠滴眼液于造模后 7 d 可显著抑制碱烧伤大鼠角膜 COX-2 及 VEGF 蛋白表达,提示溴芬酸钠滴眼液在碱烧伤后早期可能通过抑制 COX-2 及 VEGF 的过度激活而起到抑制 CNV 的作用。

Feizi 等^[2]提出,CNV 可导致角膜瘢痕形成,进而降低视力。本研究显示,造模后 28 d,各组角膜混浊、水肿均消退,但 CNV 组、模型对照组遗留角膜白斑遮挡瞳孔,溴芬酸钠组、氟米龙组遗留角膜云翳,遮挡瞳孔程度减轻,提示碱烧伤后早期应用溴芬酸钠滴眼液及 0.1% 氟米龙滴眼液可减轻角膜预后瘢痕程度。应用 PBS、溴芬酸钠滴眼液及 0.1% 氟米龙滴眼液后,大鼠角膜均出现穿孔现象,而 CNV 组未出现角膜穿孔,分析其原因可能为药物对眼表存在一定刺激性或各组大鼠用药后习惯性抓挠眼部,进而可能损伤角膜,产生不良反应;氟米龙组大鼠于造模后 7 d 后开始出现角膜穿孔,验证了目前中国临床共识中指出的角膜碱烧伤后 1 周内使用糖皮质激素眼用制剂较为安全,2 周后继续使用易发生角膜融解的观点^[30]。造模后 28 d 内,溴芬酸钠组角膜穿孔发生率为 10%,低于氟米龙组的 30%,提示溴芬酸钠滴眼液产生的不良反应较 0.1% 氟米龙滴眼液小;Lee 等^[31]将溴芬酸钠与氟米龙应用于人角膜上皮细胞实验发现,溴芬酸钠可产生更低的细胞毒性,与本研究结果一致。本研究中各造模组均出现 10%~30% 的前房积血情况,且溴芬酸钠组前房积血发生率高于氟米龙组,其可能原因在于碱烧伤后生理盐水冲洗不充分或溴芬酸钠滴眼液减轻充血作用弱于 0.1% 氟米龙滴眼液。临床眼部化学伤病例复杂,对角膜及角膜缘烧伤严重程度不可控,本研究控制烧伤范围大小及位置,与临床略有差异,仅为临床辅助用药提供参考依据。

综上所述,本研究结果表明溴芬酸钠滴眼液和 0.1% 氟米龙滴眼液均可有效减轻碱烧伤诱导的大鼠角膜炎症,早期可抑制 COX-2 及 VEGF 表达,抑制 CNV 的生成与发展,二者作用效果相当。本研究中尚

存在一定的不足之处:(1)由于观察周期长、分组多,导致每组样本量较小,后续可精确对造模后7d内进行机制探究;(2)此次实验未对各组角膜上皮损伤愈合情况进行探究,仅应用溴芬酸钠滴眼液对 CNV 的无影响进行探讨,后续会更加全面且深入地探讨其治疗作用及机制。此外,本实验过程中发现每次用药后大鼠习惯性抓挠眼部4~8次,过程中爪子接触眼部可能损伤角膜,加重角膜病变,为今后实验提供参考。溴芬酸钠滴眼液可抑制大鼠碱烧伤后 CNV 的发生,但同时也出现烧伤后并发症情况,今后可考虑联合用药或作为手术前后辅助治疗药物进行应用探究,为进一步开拓碱烧伤治疗手段提供了新的思路。

参考文献

- Lee JE, Kim KL, Kim D, et al. Apatinib-loaded nanoparticles suppress vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and experimental corneal neovascularization[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 4813-4822. DOI:10.2147/IJN.S135133.
- Feizi S, Azari AA, Safapour S. Therapeutic approaches for corneal neovascularization[J/OL]. *Eye Vis (Lond)*, 2017, 4: 28 [2018-07-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29234686>. DOI: 10.1186/s40662-017-0094-6.
- Cursiefen C, Colin J, Dana R, et al. Consensus statement on indications for anti-angiogenic therapy in the management of corneal diseases associated with neovascularisation: outcome of an expert roundtable[J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(1): 3-9. DOI:10.1136/bjo.2011.204701.
- Licican EL, Nguyen V, Sullivan AB, et al. Selective activation of the prostaglandin E2 circuit in chronic injury-induced pathologic angiogenesis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(12): 6311-6320. DOI:10.1167/iovs.10-5455.
- Lopez ES, Ortiz GA, Potilinski C, et al. Corneal neovascularization: a combined approach of bevacizumab and suramin showed increased antiangiogenic effect through downregulation of BFGF and P2X2[J]. *Curr Eye Res*, 2018, 43(4): 466-473. DOI: 10.1080/02713683.2017.1416146.
- Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. Mediators of ocular angiogenesis[J]. *J Genet*, 2009, 88(4): 495-515.
- Qu M, Wang Y, Yang L, et al. Different cellular effects of four anti-inflammatory eye drops on human corneal epithelial cells: independent in active components[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 3147-3155.
- 李莹. 新一代非甾体药物——溴芬酸钠在屈光手术的应用及注意事项[J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(11): 965-967. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.002.
Li Y. Application and notice of a new generation of non-steroidal eye drops in refractive surgery[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30(11): 965-967. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.002.
- Yoshinaga N, Arimura N, Otsuka H, et al. NSAIDs inhibit neovascularization of choroid through HO-1-dependent pathway[J]. *Lab Invest*, 2011, 91(9): 1277-1290. DOI:10.1038/labinvest.2011.101.
- Ferrari G, Bignami F, Giacomini C, et al. Safety and efficacy of topical infliximab in a mouse model of ocular surface scarring[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(3): 1680-1688. DOI: 10.1167/iovs.12-10782.
- Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review[J]. *Surv Ophthalmol*, 1998, 43(3): 245-269.
- Altan S, Sağsöz H, Oğurtan Z. Topical dimethyl sulfoxide inhibits corneal neovascularization and stimulates corneal repair in rabbits following acid burn[J]. *Biotech Histochem*, 2017, 92(8): 619-636. DOI:10.1080/10520295.2017.1371333.
- Pokhrel PK, Loftus SA. Ocular emergencies[J]. *Am Fam Physician*, 2007, 76(6): 829-836.
- Liu CH, Wang Z, Sun Y, et al. Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies[J]. *FASEB J*, 2017, 31(11): 4665-4681. DOI:10.1096/fj.201700336R.
- Bian F, Shin CS, Wang C, et al. Dexamethasone drug eluting nanowafers control inflammation in alkali-burned corneas associated with dry eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(7): 3222-3230. DOI: 10.1167/iovs.16-19074.
- Brodovsky SC, McCarty CA, Snibson G, et al. Management of alkali burns: an 11-year retrospective review[J]. *Ophthalmology*, 2000, 107(10): 1829-1835.
- Pradhan N, Guha R, Chowdhury S, et al. Curcumin nanoparticles inhibit corneal neovascularization[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93(10): 1095-1106. DOI:10.1007/s00109-015-1277-z.
- Wyględowska-Promieńska D, Piotrowska-Gwóźdź A, Piotrowska-Seweryn A, et al. Combination of aflibercept and bromfenac therapy in age-related macular degeneration: a pilot study aflibercept and bromfenac in AMD[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 3906-3912.
- Pinna A, Blasetti F, Ricci GD, et al. Bromfenac eyedrops in the treatment of diabetic macular edema: a pilot study[J]. *Eur J Ophthalmol*, 2017, 27(3): 326-330. DOI:10.5301/ejo.5000888.
- 邹桂玉, 赵敏, 计岩. 溴芬酸钠/壳聚糖纳米粒蛋白胶膜羊膜的制备及其对兔角膜新生血管的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(6): 495-499.
Wu GY, Zhao M, Ji Y. Preparation of bromfenac sodium/chitosan nanoparticles loaded fibrin-binding amniotic membrane and its effect on rabbit corneal neovascularization *in vitro*[J]. *Acta Acad Med Militaris Tertiae*, 2013, 35(6): 495-499.
- Clare G, Suleman H, Bunce C, et al. Amniotic membrane transplantation for acute ocular burns[J/OL]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, (9): CD009379 [2018-08-19]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972141>. DOI:10.1002/14651858.CD009379.pub2.
- Zahir-Jouzani F, Mahbod M, Soleimani M, et al. Chitosan and thiolated chitosan: Novel therapeutic approach for preventing corneal haze after chemical injuries[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 179: 42-49. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.09.062.
- 曲明刚, 段豪云, 王瑶, 等. 三种常用非甾体类抗炎滴眼液对人角膜上皮细胞的毒性研究[J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(7): 627-632. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.012.
Qu ML, Duan HY, Wang Y, et al. Cytotoxicity research of three non-steroidal anti-inflammatory eye drops in human corneal epithelial cells[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(7): 627-632. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.012.
- Han Y, Shen M, Tang LY, et al. Antiangiogenic effects of catalpol on rat corneal neovascularization[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2187-2194. DOI:10.3892/mmr.2017.8114.
- 凌士奇, 黎伟华, 徐建刚, 等. 碱烧伤后角膜新生淋巴管与炎症反应指数间的关联[J]. *中华眼科杂志*, 2010, 46(11): 1000-1005. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.11.009.
Ling SQ, Li WH, Xu JG, et al. The relationship between corneal lymphangiogenesis and inflammation index after corneal alkali injury[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2010, 46(11): 1000-1005. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.11.009.
- 白军强, 赵世红, 秦海峰, 等. 枸橼酸-磷酸二钠缓冲液冲洗对小鼠急性角膜化学伤眼表的保护作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(2): 122-127. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.006.
Bai JQ, Zhao SH, Qin HF, et al. Protective effects of citric acid-disodium hydrogen phosphate rinsing solution on ocular surface of mice with acute chemically induced corneal burns[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(2): 122-127. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.006.
- Biswas PS, Banerjee K, Kim B, et al. Role of inflammatory cytokine-induced cyclooxygenase 2 in the ocular immunopathologic disease herpetic stromal keratitis[J]. *J Virol*, 2005, 79(16): 10589-10600. DOI:10.1128/JVI.79.16.10589-10600.2005.
- Wang Q, Yang J, Tang K, et al. Pharmacological characteristics and efficacy of a novel anti-angiogenic antibody FD006 in corneal neovascularization[J/OL]. *BMC Biotechnol*, 2014, 14: 17 [2018-09-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24575750>. DOI: 10.1186/1472-6750-14-17.
- Kim DW, Lee SH, Shin MJ, et al. PEP-1-FK506BP inhibits alkali burn-induced corneal inflammation on the rat model of corneal alkali injury[J]. *BMB Rep*, 2015, 48(11): 618-623.
- 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 我国糖皮质激素眼用制剂在角膜和眼表疾病治疗中应用的专家共识(2016年)[J]. *中华眼科杂志*, 2016, 52(12): 894-897. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2016.12.005.
- Lee JS, Kim YH, Park YM. The Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory eye drops against human corneal epithelial cells *in vitro*[J]. *J Korean Med Sci*, 2015, 30(12): 1856-1864. DOI: 10.3346/jkms.2015.30.12.1856.

(收稿日期:2018-09-28 修回日期:2019-01-30)

(本文编辑:张宇)