

重组胶原蛋白滴眼液对兔角膜损伤修复的疗效分析

刘鑫¹ 何亮² 李华¹ 崔君茹³ 齐磊¹ 徐兰举¹

¹河北纳科生物科技有限公司, 石家庄 050000; ²保定市食品药品检验所, 保定 071000; ³河北医科大学新药安全评价研究中心, 石家庄 050000

通信作者: 徐兰举, Email: 376658402@qq.com

【摘要】 目的 探讨重组胶原蛋白滴眼液(RCED)对兔角膜碱烧伤模型中角膜损伤修复的治疗效果。方法 将L929细胞分为空白对照组、阳性对照组、阴性对照组和RCED组,分别采用正常细胞培养液、10%二甲亚砜溶液、高密度聚乙烯膜浸提液和RCED培养24h,采用噻唑蓝实验检测各组细胞毒性。将永生化人角膜上皮细胞(HCE-T)分为空白对照组和RCED组,分别采用正常细胞培养液和RCED培养24h,采用细胞计数试剂盒8(CCK-8)实验和细胞划痕实验检测RCED对HCE-T细胞增殖和迁移能力的影响。选取12只新西兰白兔,采用随机数字表法将其随机分为正常对照组、模型对照组、阳性对照组和RCED组,每组3只。正常对照组未做任何处理;模型对照组、阳性对照组、RCED组建立角膜碱烧伤模型,造模成功当日分别采用生理盐水溶液、硫酸软骨素滴眼液、RCED治疗,连续给药14d。治疗后14d进行兔角膜混浊度评分和荧光素钠染色,并在裂隙灯显微镜下拍照记录角膜愈合情况,计算角膜上皮愈合率。采用苏木精-伊红染色法观察各组兔角膜结构及炎症情况;采用免疫组织化学染色法检测各组 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素6(IL-6)的表达情况。结果 体外细胞实验结果显示,阴性对照组细胞吸光度值与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);RCED组细胞增殖率和细胞迁移率分别为(135.17 \pm 11.75)%和(35.18 \pm 7.83)%,明显高于空白对照组的(100.00 \pm 0.00)%和(16.03 \pm 3.96)%,差异均有统计学意义($t=7.33, 3.78$, 均 $P<0.05$)。在体动物实验证实,治疗后14d,阳性对照组和RCED组愈合率均高于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);模型对照组角膜透明度评分高于正常对照组,阳性对照组和RCED组角膜透明度评分均低于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。苏木精-伊红染色结果证实,RCED可增加兔角膜上皮细胞的完整性,基质胶原纤维排列更规则,减轻角膜充血和炎症细胞浸润。免疫组织化学染色结果证实,与正常对照组相比,模型对照组 α -SMA、TNF- α 和IL-6表达明显上调,阳性对照组和RCED组 α -SMA、TNF- α 和IL-6表达较模型对照组明显下降,其中RCED组下降更明显,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 RCED对L929细胞无潜在细胞毒性,可显著促进HCE-T细胞的增殖和迁移。在兔角膜碱烧伤的修复治疗中,RCED可明显促进角膜愈合,改善角膜透明度,降低组织内的纤维化和炎症水平。

【关键词】 角膜; 碱烧伤; 重组胶原蛋白滴眼液; 损伤修复

基金项目: 河北省重大科技成果转化专项(22281301Z)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250228-00059

Analysis of the effect of recombinant collagen eye drops on repairing corneal injury in rabbits

Liu Xin¹, He Liang², Li Hua¹, Cui Junru³, Qi Lei¹, Xu Lanju¹

¹Hebei NACOL Biotechnology Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China; ²Baoding Food and Drug Inspection Institute, Baoding 071000, China; ³The Center for New Drug Safety Evaluation and Research of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: Xu Lanju, Email: 376658402@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the therapeutic effect of recombinant collagen eye drops (RCED) on corneal injury repair in a rabbit corneal alkali burn model. **Methods** L929 cells were divided into a control group, a positive control group, a negative control group, and an RCED group, and cultured with normal cell culture medium, 10% dimethyl sulfoxide solution, high-density polyethylene membrane extract and RCED for 24 hours, respectively. The cytotoxicity on L929 cells in each group was detected by thiazolyl blue assay. Human corneal epithelial cells-transformed (HCE-T) were divided into a control group and an RCED group and were cultured in normal cell culture medium and RCED for 24 hours, respectively. The cell counting kit-8 (CCK-8) assay and cell scratch assay were used to detect the effects of RCED on the proliferation and migration abilities of HCE-T cells.

Twelve New Zealand rabbits were randomly divided into a normal control group, a model control group, a positive control group and an RCED group by the random number table method, with 3 rabbits in each group. The normal control group received no treatment. Corneal alkali burn models were established in the model control group, positive control group and RCED group. On the day of successful modeling, the rabbit eyes in the model control group, positive control group and RCED group were treated with normal saline solution, chondroitin sulfate eye drops and RCED for 14 continuous days, respectively. After 14 days of treatment, corneal turbidity score and sodium fluorescein staining were performed in all groups, and corneal healing was recorded by photographing under a slit lamp, and the corneal epithelial healing rate was calculated. Hematoxylin-eosin staining was performed to observe the pathological staining of all groups and the expression differences of α -smooth muscle actin (α -SMA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6) were detected by immunohistochemistry. This experiment was conducted at the Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Hebei Medical University, and the experimental protocol was reviewed and approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of the Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Hebei Medical University (No. IACUC-Hebyd AP-2023018). **Results** The results of *in vitro* cell experiments confirmed that there was no significant difference in cell absorbance values between the blank control group and the negative control group ($P>0.05$); the cell proliferation rate and cell migration rate in the RCED group were $(135.17\pm 11.75)\%$ and $(35.18\pm 7.83)\%$, significantly higher than the blank control group $(100.00\pm 0.00)\%$ and $(16.03\pm 3.96)\%$, showing statistically significant differences ($t=7.33, 3.78$; both $P<0.05$). *In vivo* animal experiments confirmed that after 14 days of treatment, the healing rates of the positive control group and the RCED group were both higher than those of the model control group, with statistically significant differences (both $P<0.05$). The corneal transparency score of the model control group was higher than that of the normal control group, and the corneal transparency score of the positive control group and the RCED group were both lower than those of the model control group, with statistically significant differences (all $P<0.05$). The hematoxylin-eosin staining results confirmed that RCED treatment could increase the integrity of corneal epithelial cells in rabbits, make the arrangement of matrix collagen fibers more regular, and reduce corneal congestion and inflammatory cell infiltration. The immunohistochemical staining results confirmed that the expressions of α -SMA, TNF- α and IL-6 in the model control group were significantly upregulated compared with the normal control group, and the expressions of α -SMA, TNF- α and IL-6 in the positive control group and the RCED group were significantly decreased compared with the model group. Among them, the expressions of α -SMA, TNF- α and IL-6 in the RCED group decreased more significantly, and the differences were statistically significant (all $P<0.05$). **Conclusions** RCED has no potential cytotoxicity to L929 cells, and can significantly promote the proliferation and migration of HCE-T cells. In the treatment of corneal alkali burn in rabbits, it can significantly promote corneal healing, improve corneal transparency, and reduce the level of fibrosis and inflammation in the tissue.

[Key words] Cornea; Alkali burn; Recombinant collagen eye drops; Damage repair

Fund program: Hebei Province Major Scientific and Technological Achievements Conversion Special Project (22281301Z)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250228-00059

角膜由上皮细胞、基质细胞和内皮细胞组成,是一种透明的无血管组织,是眼光学系统的重要组成部分,并为眼球内部结构提供保护作用^[1-2]。角膜的神经支配较为密集,主要包含了与疼痛有关的感觉神经元,因此角膜损伤往往会造成剧烈疼痛^[3]。角膜损伤可能由外伤、角膜发育异常、感染、眼干燥症、角膜炎等原因引起。化学碱烧伤是造成严重眼部损伤的原因之一,眼部化学烧伤是需要立即治疗的眼科急症,其发生率为 11.5%~22.1%^[4]。角膜损伤后会造角膜上皮细胞脱落,导致角膜透明度下降,影响患者视觉功能,还可能引发角膜溃疡或角膜穿孔,严重影响患者的生活质量^[5]。角膜损伤的病理机制复杂,并发症多且病程长^[6]。重要的是,角膜损伤常导致视力受损,甚至致盲,给患者和社会带来沉重负担^[7-8]。目前,治疗角膜

损伤的常用药物包括预防感染的抗生素、抗炎的类固醇、保持眼表湿润的人工泪液等。但长期使用抗生素可导致耐药性和眼表毒性;类固醇会延迟伤口愈合且因免疫抑制而增加感染风险;人工泪液仅能提供暂时的缓解作用,而不能从根本上解决角膜损伤问题^[9]。因此,寻找更加有效的药物治疗方法对于角膜上皮损伤具有重要意义。

胶原蛋白是角膜细胞外基质中的主要蛋白成分,占角膜干重的 70%,其中含量最高的胶原蛋白类型是 I 型胶原蛋白^[10]。碱烧伤可严重损害眼表,导致角膜透明度丧失,视力明显下降^[11]。角膜透明度取决于胶原原纤维窄而均匀的直径及其在角膜基质内的有序排列^[12]。目前,多数胶原蛋白提取自动物,存在免疫反应和潜在病原体污染等生物安全风险^[13]。重组人源

化胶原蛋白基于人体胶原蛋白序列,经优化设计后通过合成生物学技术获得与人体自身胶原蛋白高度一致的序列,具有高产能、批次稳定和低病毒传播风险。重组胶原蛋白可用于制作伤口敷料,由其制备的敷料具有理想孔径,有利于水分的吸收和保留,保证营养物质和氧气的进入以及代谢废物的清除,为皮肤伤口提供湿润的环境,促进创面愈合^[14]。重组胶原蛋白能够模拟天然胶原蛋白的功能,促进细胞再生与迁移、血管生成和伤口愈合,在皮肤再生修复、药物递送、软骨及牙周韧带组织工程领域具有显著应用潜力^[15]。

本研究将重组人源化胶原蛋白开发为重组胶原蛋白滴眼液(recombinant collagen eye drops, RCED),用于治疗角膜炎、角膜溃疡、角膜损伤等。通过体外细胞实验探究其生物相容性和对永生生化人角膜上皮细胞(human cornea epithelial cell-transformed, HCE-T)增殖和迁移能力的影响。此外,通过建立兔角膜碱烧伤模型,观察 RCED 对兔角膜损伤修复的潜在影响,明确治疗效果,旨在为角膜损伤修复治疗提供新的方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞及动物来源 L929 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;HCE-T 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。4~5 月龄健康新西兰白兔 12 只,雌雄兼用,体质量 2.1~2.4 kg,购自辽宁长生生物技术股份有限公司。本实验在河北医科大学新药安全评价研究中心进行(许可证号:SYXK[冀]2023-008),实验动物的饲养和使用遵循 3R 原则,实验方案获得河北医科大学新药安全评价研究中心实验动物伦理委员会审核批准(批文号:IACUC-Hebyd AP-2023018)。

1.1.2 主要试剂及仪器 复配型 RCED(批号:RCED20231001,河北纳科生物科技有限公司);硫酸软骨素滴眼液(批号 22031602,山东博士伦福瑞达制药有限公司);氯霉素滴眼液(批号 230812,邯郸康业制药有限公司);细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒、MEM 培养液、HCE-T 细胞专用培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司);异丙醇(天津市永大化学试剂有限公司);胎牛血清(以色列生物产业百特哈艾迈克有限公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液、苏木精-伊红染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);盐酸利多卡因注射液(湖南科伦制药有限公司);戊巴比妥钠(德国默克生物科技公司);生理盐水注射液(石家庄四药有限公司);鼠抗兔

α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体、鼠抗兔肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)抗体、鼠抗兔白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)抗体(美国 Immunoway 公司);DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司)。高密度聚乙烯膜(日本 Hatano 研究所);荧光素钠眼科检测试纸(天津伊诺新康医疗器械科技有限公司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司);二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司);酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);注射泵(保定兰格恒流泵有限公司);冷冻切片(德国 Leica 公司);烘片机、摊片机(中国天津航利达公司);脱水机、包埋机(上海徠卡仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 噻唑蓝法检测 RCED 对 L929 细胞的毒性 按照 GB/T 16886. 5-2017 中规定的噻唑蓝(methyl thiazoyl tetrazolium, MTT)实验方法进行 RCED 样品细胞毒性检测,选择 L929 细胞为实验细胞。将细胞接种至 96 孔板内,细胞密度为 1×10^5 个/ml,每孔接种体积为 100 μ l;在细胞培养箱培养 24 h 后,弃掉细胞培养液,将细胞分为空白对照组、阴性对照组、阳性对照组、RCED 组,分别加入 100 μ l 正常细胞培养液、高密度聚乙烯膜浸提液(高密度聚乙烯膜按 3 cm^2 /ml 的比例加入含 10%胎牛血清的 MEM 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 浸提 24 h)、10% DMSO 溶液和 RCED;培养 24 h 后,加入 50 μ l MTT 溶液,继续在培养箱内培养 2 h,弃掉孔内 MTT 溶液,加入 100 μ l 异丙醇溶液;孔板涡旋混匀后,检测各孔在 570 和 650 nm 双波长下的吸光度值。

1.2.2 CCK-8 法检测 RCED 对 HCE-T 细胞增殖能力的影响 HCE-T 细胞按 5×10^3 个细胞/孔密度接种在 96 孔板内,细胞接种体积为 100 μ l;培养 24 h 后,弃掉原有培养液,将细胞分为空白对照组和 RCED 组,分别加入正常细胞培养液和含体积分数 10%RCED 的细胞培养液;培养 24 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度,计算细胞增殖率。细胞增殖率(%)=(RCED 组吸光度值-空白对照组吸光度值)/空白对照组吸光度值 \times 100%。

1.2.3 细胞划痕法检测 RCED 对 HCE-T 细胞迁移能力的影响 HCE-T 细胞按 10^6 个细胞/孔密度接种在 6 孔板内。将细胞分为空白对照组和 RCED 组,待其细胞密度约为 80%时,使用枪头进行细胞表面划痕,拍照,记录此时的划痕面积 W_1 ;分别加入无血清细胞培养液和含体积分数 10%RCED 的无血清培养液,培养 24 h 后记录划痕面积 W_2 。各组细胞迁移率 =

$(W_1 - W_2) / W_1 \times 100\%$ 。

1.2.4 实验动物分组及碱烧伤模型建立 采用随机数字表法将 12 只新西兰白兔随机分为正常对照组、模型对照组、阳性对照组、RCED 组, 每组 3 只。正常对照组未进行特殊处理, 其他各组以 1.2 mg/kg 在兔耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠麻醉, 辅以利多卡因进行眼部局部麻醉; 使用直径 10 mm 角膜环钻轻轻置于角膜中央, 需保持环钻与角膜面垂直, 避免倾斜, 将 1 mol/L 氢氧化钠溶液倒入环钻中, 使其浸没角膜 1 min; 用棉签吸去氢氧化钠溶液, 移除环钻, 迅速用无菌生理盐水冲洗角膜碱烧伤区域 1 min, 制备兔双眼角膜碱烧伤模型。造模即刻, 角膜迅速出现瓷白色混浊, 经荧光素钠染色和裂隙灯显微镜下蓝光观察, 角膜部位出现大面积黄色损伤, 即为造模成功。造模成功后, 各组每日常规给予氯霉素滴眼液 2 滴预防感染。造模成功当日, 模型对照组、阳性对照组、RCED 组分别采用生理盐水溶液、硫酸软骨素滴眼液、RCED 点眼, 4 次/d, 连续给药 14 d。

1.2.5 兔角膜碱烧伤愈合效果评价 造模当日和造模后 14 d 行兔双眼角膜荧光素钠染色, 在裂隙灯显微镜下拍照记录角膜情况。采用 ImageJ 软件测量染色面积, 并计算角膜上皮愈合率, 角膜上皮愈合率 = (造模当日染色面积 - 造模后 14 d 染色面积) / 造模当日染色面积 $\times 100\%$ 。

1.2.6 兔角膜透明度评分 造模后每日观察角膜情况, 如有无炎症、瞳孔边缘变化和角膜混浊度变化等, 于造模后 14 d 进行角膜透明度评分^[16]: 角膜透明为 0 分; 极轻度角膜混浊为 1 分; 轻度角膜混浊, 可见瞳孔边缘和虹膜血管为 2 分; 中度角膜基质混浊, 仅可见瞳孔边缘为 3 分; 重度角膜基质混浊, 可见前房为 4 分; 最大角膜基质混浊, 前房完全模糊为 5 分。各实验组的兔角膜透明度评分越高, 表明角膜透明度越差。

1.2.7 苏木精-伊红染色法观察兔角膜结构及炎症情况 过量麻醉法处死新西兰白兔并摘除眼球, 使用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋; 沿矢状面切片, 切片厚度为 5 μm ; 二甲苯中脱蜡 2 次, 每次 8 min; 在梯度浓度乙醇 (100%、95%、85% 和 75%) 中复水, 每个浓度 3 min, 蒸馏水浸泡 2 min; 苏木素染色 5 min, 蒸馏水清洗; 分化液分化 30 s, 滴加蒸馏水清洗 2 次, 每次 4 min; 滴加伊红染色液染色 1 min, 弃去多余染色液, 梯度浓度乙醇 (75%、85%、95% 和 100%) 中脱水, 二甲苯中透明 2 次, 每次 1 min; 中性树胶封片, 在显微镜下拍照。

1.2.8 免疫组织化学染色法评估兔角膜中 α -SMA、

TNF- α 和 IL-6 的表达 取 1.2.7 部分石蜡切片, 样品进行脱蜡和抗原修复, 山羊血清封闭 45 min, 一抗孵育过夜; 用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 4 h; 用 DAB 显色处理用苏木精染色液复染, 中性树胶封片, 在显微镜下拍照。采用 ImageJ 软件分析 α -SMA、TNF- α 和 IL-6 染色强度的积分光密度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 个组各指标比较采用独立样本 t 检验; 4 个组各指标总体比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey 检验。采用双尾检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RCED 对 L929 细胞的毒性评价

空白对照组、阴性对照组、阳性对照组、RCED 组吸光度值分别为 0.49 ± 0.05 、 0.50 ± 0.08 、 0.04 ± 0.01 和 0.62 ± 0.09 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 85.26, P < 0.01$), 其中阳性对照组较空白对照组明显降低、RCED 组较空白对照组明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 1)。

2.2 各组细胞增殖能力比较

空白对照组和 RCED 组细胞增殖率分别为 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 和 $(135.17 \pm 11.75)\%$, RCED 组细胞增殖率较空白对照组显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 7.33, P < 0.01$) (图 2)。

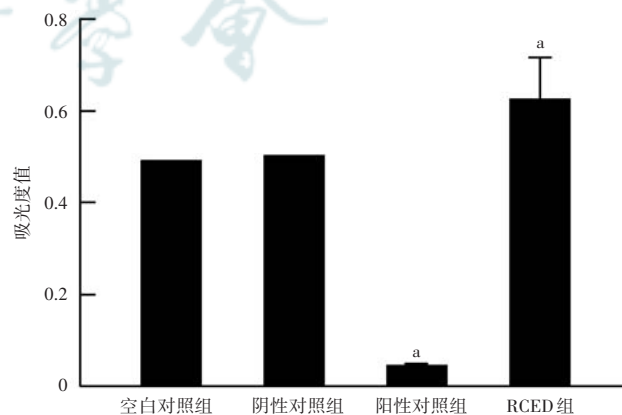


图 1 不同处理组 L929 细胞毒性比较 $F = 85.26, P < 0.01$. 与空白对照组比较, $^*P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验; $n = 3$) RCED: 重组胶原蛋白滴眼液

Figure 1 Comparison of L929 cell cytotoxicity among different treatment groups $F = 85.26, P < 0.01$. Compared with blank control group, $^*P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n = 3$) RCED: recombinant collagen eye drops

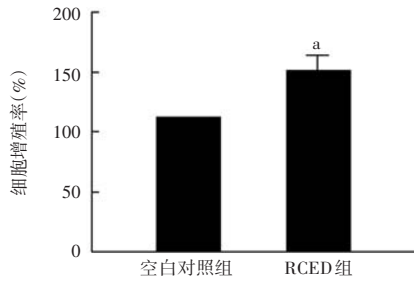


图 2 空白对照组与 RCED 组 HCE-T 细胞增殖率比较 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) RCED: 重组胶原蛋白滴眼液

Figure 2 Comparison of the proliferation rate of HCE-T cells between control group and RCED group Compared with blank control group, ^a $P < 0.05$ (Independent samples t -test, $n = 3$) RCED: recombinant collagen eye drops

2.3 各组细胞迁移能力比较

空白对照组和 RCED 组细胞迁移率分别为 $(16.03 \pm 3.96)\%$ 和 $(35.18 \pm 7.83)\%$, RCED 组较空白对照组显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 3.78, P < 0.05$) (图 3)。

2.4 各组兔角膜碱烧伤愈合效果比较

造模后第 14 天, 正常对照组兔角膜荧光素钠染色阴性, 未见损伤; 模型对照组兔角膜仍有较大面积的黄色染色区域, 角膜愈合率为 $(67.67 \pm 5.57)\%$; 阳性对照组黄色染色区域减小, 角膜愈合率为 $(75.83 \pm 2.48)\%$; RCED 组黄色染色区域明显减小, 角膜愈合率为 $(87.50 \pm 3.39)\%$ 。各

组角膜愈合率总体比较差异有统计学意义 ($F = 97.75, P < 0.001$), 阳性对照组和 RCED 组愈合率均高于模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

2.5 各组兔角膜透明度评分比较

造模后第 14 天, 模型对照组结膜囊内分泌物增加, 角膜白色分泌物蓄积严重, 角膜重度混浊; 阳性对照组角膜中度混浊, 可见瞳孔边缘; RCED 组角膜轻度混浊, 可见瞳孔边缘和虹膜血管。模型对照组和阳性对照组角膜透明度差, 影响新生血管的观察, 但在 RCED 组仅观察到少量新生血管。模型对照组、阳性对照组、RCED 组角膜透明度评分分别为 (3.67 ± 0.52) 、 (2.83 ± 0.41) 、 (2.17 ± 0.41) 分, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 98.52, P < 0.001$), 其中阳性对照组和 RCED 组角膜透明度评为均低于模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 5)。

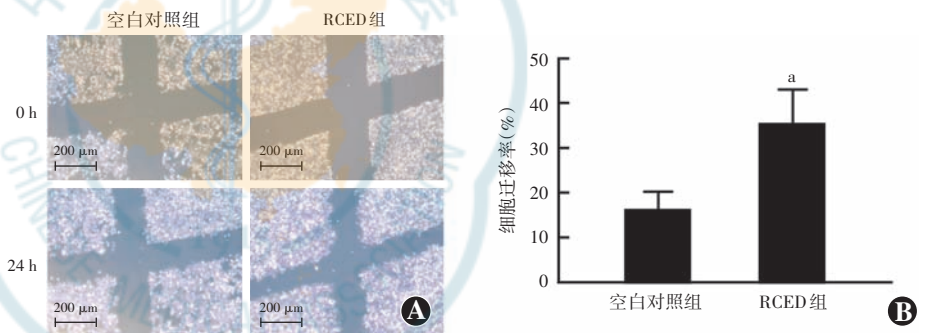


图 3 空白对照组和 RCED 组 HCE-T 细胞迁移率比较 A: 细胞划痕实验结果 ($\times 40$, 标尺 = $200 \mu\text{m}$) B: 细胞迁移率比较 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) RCED: 重组胶原蛋白滴眼液

Figure 3 Comparison of migration rates of HCE-T cells between blank control group and RCED group A: Cell scratch assay result ($\times 40$, scale bar = $200 \mu\text{m}$) B: Comparison of cell mobility between two groups Compared with blank control group, ^a $P < 0.05$ (Independent samples t -test, $n = 3$) RCED: recombinant collagen eye drops

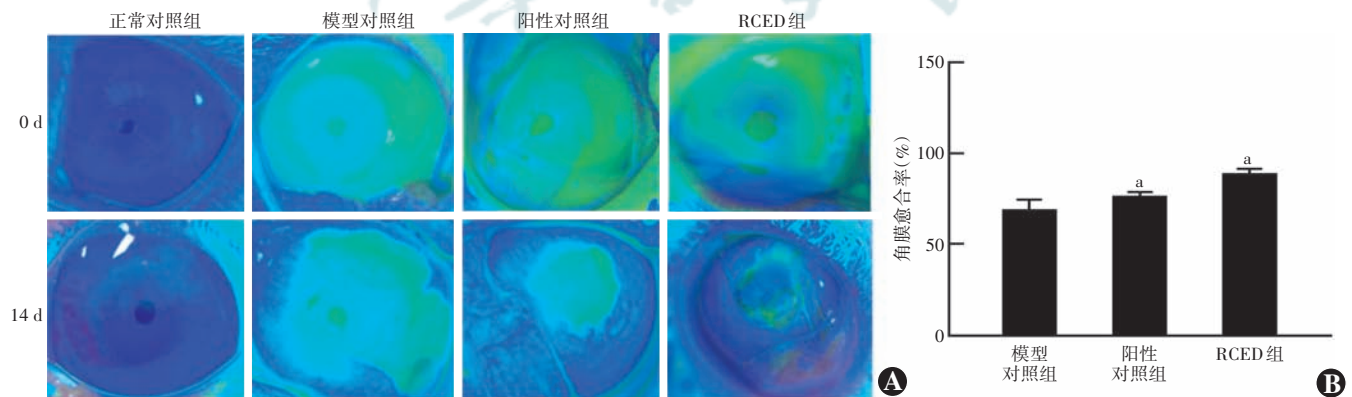


图 4 各组兔角膜愈合率分析 A: 各组兔角膜荧光素钠染色图 B: 各组角膜愈合率比较 $F = 97.75, P < 0.001$. 与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验; $n = 6$) RCED: 重组胶原蛋白滴眼液

Figure 4 Analysis of corneal healing rates in each group of rabbits A: Corneal fluorescein sodium staining results in different groups B: Comparison of corneal healing rate among different experimental groups $F = 97.75, P < 0.001$. Compared with model control group, ^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n = 6$) RCED: recombinant collagen eye drops

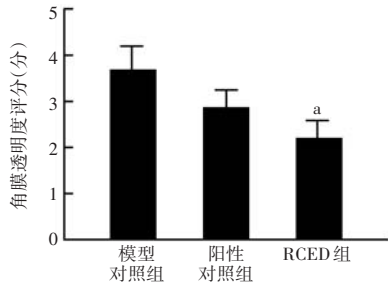


图 5 各组兔角膜透明度评分比较 $F=98.52, P<0.001$ 。与模型对照组比较, ^a $P<0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验; $n=6$) RCED: 重组胶原蛋白滴眼液

Figure 5 Analysis of corneal transparency in each group of rabbits $F=98.52, P<0.001$. Compared with model control group, ^a $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n=6$) RCED: recombinant collagen eye drops

2.6 各组兔角膜组织苏木精-伊红染色结果比较

治疗第 14 天, 正常对照组兔角膜上皮细胞完整, 基质胶原纤维排列规则清晰, 基质细胞横向排列于胶原板层之间, 无充血和炎性细胞浸润情况; 模型对照组兔角膜上皮细胞断裂, 基质胶原纤维排列紊乱, 存在充血和炎性细胞浸润; 阳性对照组兔角膜上

皮细胞较为完整, 基质胶原纤维排列基本规则, 充血和炎性细胞浸润较模型对照组减轻; RCED 组兔角膜上皮细胞完整, 接近正常对照组, 基质胶原纤维排列规则, 充血和炎性细胞浸润较阳性对照组明显减少(图 6)。

2.7 各组兔角膜组织 α -SMA、TNF- α 和 IL-6 染色结果比较

治疗第 14 天, 模型对照组角膜组织中 α -SMA、TNF- α 和 IL-6 阳性着色较正常对照组深; 阳性对照组和 RCED 组中, α -SMA、TNF- α 和 IL-6 阳性着色较模型对照组减少(图 7)。各组 α -SMA、TNF- α 和 IL-6 光密度值总体比较差异均有统计学意义($F=92.63, 55.56, 70.40$, 均 $P<0.001$), 其中与正常对照组相比, 模型对照组 α -SMA、TNF- α 和 IL-6 表达明显上调, 阳性对照组和 RCED 组 α -SMA、TNF- α 和 IL-6 表达较模型对照组明显下降, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 1)。

3 讨论

角膜上皮细胞的增殖和迁移能力是角膜伤口愈合的基础, 有助于恢复角膜结构和功能的完整性^[17]。 α -SMA 被用作活化肌成纤维细胞的标志物, 可反映角膜基质中纤维化的活化程度^[18]。角膜基质细胞转化为肌成纤维细胞并发生纤维化反应, 会导致角膜透明度丧失。炎症因子 IL-6 在碱烧伤早期产生, 主要位于再生的角膜上皮基底细胞。在角膜中, IL-6 与角膜神经功能障碍有关, 会导致角膜神经退化^[19]。RCED 中含有的重组胶原蛋白, 是具有促进眼表组织修复功能的生物合成材料^[20]; 与动物胶原相比, 其可大幅降低病毒传播风险和免疫反应发生率, 生物相容性良好。本研究首先采用细胞实验证实 RCED 对 L929 细胞无潜在细胞毒性, 安全性良好。眼球长期暴露在大气环境中, 易受到环境中各种污染物的影响。角膜位于眼球前端, 因直接与外界接触且缺乏保护结构更易受到感染和损伤, 进而引发常见的眼科疾病^[21]。HCE-T 是人眼的第

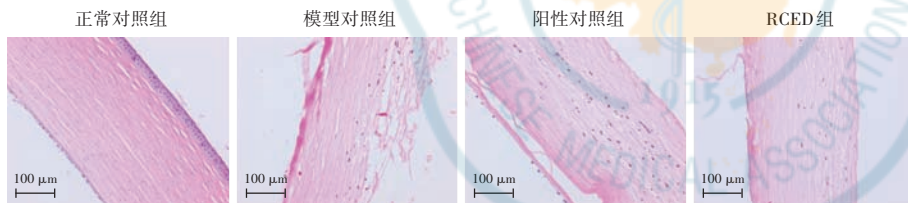


图 6 各组兔角膜组织病理染色图像(HE $\times 200$, 标尺 = 100 μm) RCED: 重组胶原蛋白滴眼液
Figure 6 Corneal histopathological staining images of rabbits in each group (HE $\times 200$, scale bar = 100 μm) RCED: recombinant collagen eye drops

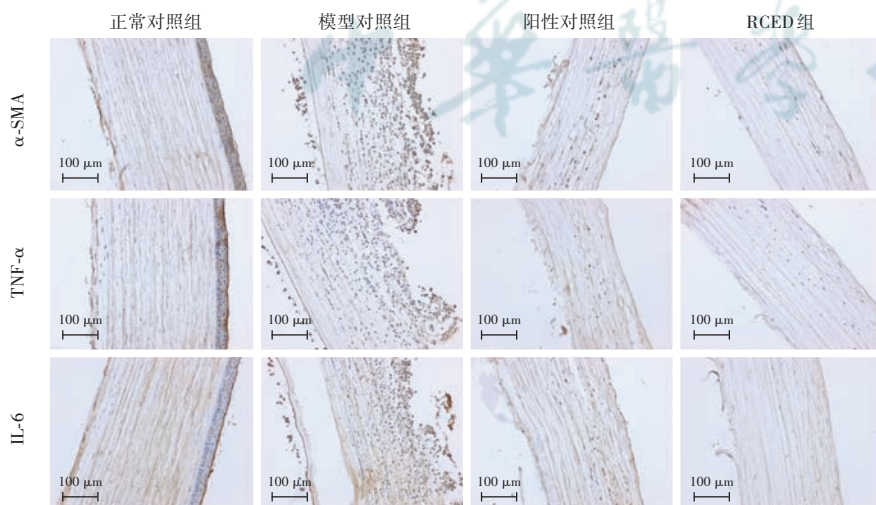


图 7 各组兔角膜 α -SMA、TNF- α 和 IL-6 免疫组织化学染色图(DAB $\times 200$, 标尺 = 100 μm) RCED: 重组胶原蛋白滴眼液; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素
Figure 7 Immunohistochemical staining of α -SMA, TNF- α and IL-6 in rabbit corneas of different groups (DAB $\times 200$, scale bar = 100 μm) RCED: recombinant collagen eye drops; α -SMA: α -smooth muscle actin; TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukin

表 1 各组兔角膜组织 α -SMA、TNF- α 和 IL-6 积分光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of corneal α -SMA, TNF- α and IL-6 intergrated optical density in rabbit corneas among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	α -SMA	TNF- α	IL-6
正常对照组	6	1.12 \pm 0.07	1.14 \pm 0.07	1.13 \pm 0.05
模型对照组	6	3.02 \pm 0.12 ^a	2.78 \pm 0.26 ^a	2.66 \pm 0.08 ^a
阳性对照组	6	2.46 \pm 0.31 ^b	1.68 \pm 0.40 ^b	1.73 \pm 0.01 ^b
RCED 组	6	1.80 \pm 0.24 ^b	1.24 \pm 0.10 ^b	1.39 \pm 0.09 ^b
F 值		92.63	55.56	70.40
P 组		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型对照组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,Tukey 检验) α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;TNF:肿瘤坏死因子;IL:白细胞介素;RCED:重组胶原蛋白滴眼液

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with model control group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) α -SMA: α -smooth muscle actin; TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukin; RCED: recombinant collagen eye drops

一道屏障,主要发挥保护作用^[22]。本研究中 CCK-8 实验和细胞划痕实验结果证实,RCED 可以显著促进 HCE-T 细胞的增殖和迁移能力,因此在角膜损伤修复方面可发挥保护作用。

兔角膜整体结构与人角膜结构相似,是研究角膜损伤的常用动物模型^[23]。碱性溶液等化学物质接触到角膜组织时,会对角膜深层组织造成严重的病理性损伤且难以治愈,导致不可逆的视力丧失,甚至致盲^[24-25]。碱烧伤能够渗透到深层角膜基质中,造成角膜基质坏死,并引起严重的炎症反应。此外,碱烧伤会产生大量蛋白水解酶,破坏蛋白多糖和胶原蛋白,引发角膜混浊、新生血管等并发症^[26]。为了证实 RCED 对角膜碱烧伤的修复效果,本研究建立兔角膜碱烧伤模型,应用 RCED 进行治疗。动物实验结果证实,RCED 可明显缓解角膜碱烧伤的病理程度,有效恢复角膜上皮细胞的完整性,改善基质胶原蛋白纤维的排列,同时减轻充血和炎症细胞的浸润。角膜新生血管形成是角膜碱烧伤后的一种自我修复过程,但其形成会影响角膜的透明度,是造成患者盲的重要病理因素之一^[27-28]。在角膜碱烧伤动物模型中,RCED 组兔角膜新生血管数目少,角膜透明度高,提示 RCED 在一定程度上具有抑制角膜新生血管形成的作用。 α -SMA 反映了肌成纤维细胞水平以及组织中的纤维化和瘢痕程度^[29]。角膜基质细胞转化为肌成纤维细胞并发生纤维化反应,会导致角膜透明度的丧失。RCED 组

α -SMA 表达水平降低,表明 RCED 具有控制角膜纤维化和瘢痕形成的能力,有助于恢复角膜透明度。炎症反应是角膜碱烧伤的重要病理变化过程,在角膜碱烧伤预后中起着主导作用。TNF- α 和 IL-6 是反映炎症反应程度的常用标志蛋白,其表达下降,证实角膜组织中炎症水平明显改善^[30]。碱烧伤后,炎症因子 TNF- α 表达水平显著升高,会延缓角膜损伤的恢复进程。过度的炎症反应会造成继发性损伤,延迟和加重角膜创面的修复进程。RCED 治疗后角膜组织中 TNF- α 和 IL-6 表达水平明显下降,表明其可以减轻角膜碱烧伤后的炎症反应,有助于角膜损伤的修复。胶原蛋白通过与免疫细胞表达受体结合,能够调节免疫细胞活性,从而为角膜损伤修复提供有利的愈合微环境。上述结果证实 RCED 治疗能够调节角膜纤维化和瘢痕形成,有效降低炎症水平,调节角膜新生血管形成,有助于角膜上皮细胞修复,增加角膜透明度,避免角膜混浊和盲的发生。

综上所述,本研究开发的 RCED 对角膜损伤有明显修复效果,可用于角膜碱烧伤后的治疗,在角膜损伤修复领域具有重要的应用价值。但本研究仍存在一定局限性,如样本量较小,实验周期有限。未来需扩大样本量,延长观察时间,深入探讨其对角膜损伤的修复作用及其机制,并开展临床试验验证其临床疗效与安全性。

利益冲突 本研究中所使用的仪器与试剂均由河北医科大学新药安全评价研究中心提供。除此之外,无其他机构为本研究提供支持。在研究过程中,所有作者均遵循学术规范,未出现任何可能干扰研究结果公正性的行为

作者贡献声明 刘鑫:酝酿和设计实验、实施研究、数据采集及分析、文章起草;何亮、齐磊:对文章的知识性内容作批评性审阅;李华:实施研究、数据采集及分析、文章修改;崔君茹:实施研究、对文章的知识性内容作批评性审阅;徐兰举:实验设计、研究指导、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿

参考文献

- [1] Yeung V, Boychev N, Kanu LN, et al. Proteomic characterization of corneal epithelial and stromal cell-derived extracellular vesicles[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(19): 10338. DOI: 10.3390/ijms251910338.
- [2] Hassan TA, Abouelela YS, Ahmed ZSO, et al. Reconstruction of rabbit corneal epithelium using adipose and/or bone marrow stem cells[J]. Exp Eye Res, 2025, 251: 110203. DOI: 10.1016/j.exer.2024.110203.
- [3] Kotoda Y, Hishiyama S, Shim J, et al. A novel quaternary ammonium N-propylamiodarone bromide provides long-lasting analgesia against corneal pain[J]. Drug Des Devel Ther, 2024, 18: 6199-6208. DOI: 10.2147/DDDT.S486031.
- [4] Chang C, Peng I, Huang Y. Recombinant thrombomodulin domain 1 modulates macrophage polarization and enhances healing in corneal alkali burns[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2025, 66(1): 21. DOI: 10.1167/iov.66.1.21.

- [5] 蒋波, 田莎, 李涛, 等. 石斛酚抑制碱烧伤大鼠角膜新生血管的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 846-855. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.004.
Jiang B, Tian S, Li T, et al. Experimental study of the inhibition of giganol on corneal neovascularization in rats by alkali burn[J]. Acta Labo Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 846-855. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.004.
- [6] 王健, 解正高, 陈放, 等. 自体血清与小牛血去蛋白眼用凝胶治疗兔角膜碱烧伤的比较[J]. 国际眼科杂志, 2020, 20(5): 782-786. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.5.08.
Wang J, Xie ZG, Chen F, et al. Comparison of autologous serum and deproteinised calf serum eye gel in the treatment of rabbit corneal alkali burn[J]. Int Eye Sci, 2020, 20(5): 782-786. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.5.08.
- [7] Zhang Q, Zhou X, Zhang W, et al. Corneal strain influences keratocyte proliferation and migration through upregulation of ALDH3A1 expression[J/OL]. FASEB J, 2024, 38(23): e70236[2025-06-16]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39652089/. DOI: 10.1096/fj.202401392R.
- [8] Zhang X, Liu H, Wan C, et al. Verteporfin combined with ROCK inhibitor promotes the restoration of corneal endothelial cell dysfunction in rats[J]. Biochem Pharmacol, 2025, 231: 116641. DOI: 10.1016/j.bcp.2024.116641.
- [9] Liu Y, Ge X, Wu X, et al. Enhanced corneal repair with hyaluronic acid/proanthocyanidins nanoparticles[J]. ACS Omega, 2025, 10(2): 2222-2230. DOI: 10.1021/acsomega.4c09159.
- [10] Li Y, Wang Z. Biomaterials for corneal regeneration[J/OL]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12(6): e2408021[2025-06-16]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39739318/. DOI: 10.1002/adv.202408021.
- [11] Goto H, Arima T, Takahashi A, et al. Trimebutine prevents corneal inflammation in a rat alkali burn model[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 12111. DOI: 10.1038/s41598-024-61112-4.
- [12] Ma Q, Riau AK, Young RD, et al. Ultrastructural aspects of corneal functional recovery in rats following intrastromal keratocyte injection[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2025, 66(2): 45. DOI: 10.1167/iovs.66.2.45.
- [13] Hao Y, Zhao B, Wu D, et al. Recombinant humanized collagen type XVII promotes oral ulcer healing via anti-inflammation and accelerate tissue healing[J]. J Inflamm Res, 2024, 17: 4993-5004. DOI: 10.2147/JIR.S470649.
- [14] Zhang S, Lu X, Chen J, et al. Promotion of angiogenesis and suppression of inflammatory response in skin wound healing using exosome-loaded collagen sponge [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1511526. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1511526.
- [15] Qu D, Xiang J, Tian J, et al. Enhancing bone repair efficiency through synergistic modification of recombinant human collagen onto PLLA membranes[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 283(Pt 4): 137631. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.137631.
- [16] 梁璐, 马涛, 王斌, 等. 间充质干细胞因子群对角膜损伤药效研究及临床初探[J]. 中国动物保健, 2020, 22(4): 45-48. DOI: 10.3969/j.issn.1008-4754.2020.04.038.
- [17] Cao Q, Xu W, Chen X, et al. PRMT1-mediated arginine methylation promotes corneal epithelial wound healing via epigenetic regulation of ANXA3[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2025, 66(1): 22. DOI: 10.1167/iovs.66.1.22.
- [18] Kim DR, Park S, Kim EJ, et al. Dexamethasone acetate loaded poly (ϵ -caprolactone) nanofibers for rat corneal chemical burn treatment[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 21806. DOI: 10.1038/s41598-024-62026-x.
- [19] Lee HJ, Kim HJ, Ko JH, et al. Myeloid cells protect corneal nerves against sterile injury through negative-feedback regulation of TLR2-IL-6 axis[J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 27. DOI: 10.1186/s12974-023-02710-3.
- [20] Wang J, Qiu H, Xu Y, et al. The biological effect of recombinant humanized collagen on damaged skin induced by UV-photoaging: an *in vivo* study[J]. Bioact Mater, 2022, 11: 154-165. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.10.004.
- [21] Yao G, Mo X, Liu S, et al. Snowflake-inspired and blink-driven flexible piezoelectric contact lenses for effective corneal injury repair [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 3604. DOI: 10.1038/s41467-023-39315-6.
- [22] Chen W, Ge P, Deng M, et al. Toxicological responses of A549 and HCE-T cells exposed to fine particulate matter at the air-liquid interface [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2024, 31(18): 27375-27387. DOI: 10.1007/s11356-024-32944-4.
- [23] Chen J, Luo Y, Xie L, et al. Long-term alterations of collagen reconstruction and basement membrane regeneration after corneal full-thickness penetrating injury in rabbits [J/OL]. PLoS One, 2025, 20(4): e0320802 [2025-06-18]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40273158/. DOI: 10.1371/journal.pone.0320802.
- [24] 宋东宇, 高明宏, 李冬梅. 人脐带间充质干细胞移植治疗角膜碱烧伤的实验研究[J]. 国际眼科杂志, 2023, 23(5): 717-722. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.5.02.
Song DY, Gao MH, Li DM. Experimental study of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of alkali -burned cornea[J]. Int Eye Sci, 2023, 23(5): 717-722. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.5.02.
- [25] Razavi MS, Ebrahimnejad P, Javar HA, et al. Development of dual-functional core-shell electrospun mats with controlled release of anti-inflammatory and anti-bacterial agents for the treatment of corneal alkali burn injuries[J]. Biomater Adv, 2023, 154: 213648. DOI: 10.1016/j.bioadv.2023.213648.
- [26] 闫雅蓉, 刘菁华, 颜鑫霖, 等. 枸杞糖肽对角膜碱烧伤小鼠角膜炎症反应及愈合的作用及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(11): 34-42. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.11.006.
Yan YR, Liu JH, Yan XL, et al. Effects and mechanisms of lycium barbarum glycopeptide on corneal inflammation and healing in alkali-burned mice[J]. China J Modern Med, 2024, 34(11): 34-42. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.11.006.
- [27] 王力之, 邹文进, 何冰冰, 等. 多西环素对角膜碱烧伤修复作用机制的研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2023, 40(11): 1928-1932. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.11.024.
Wang LZ, Zou WJ, He BB, et al. Research progress on the mechanism of doxycycline in repairing corneal alkali burns [J]. J Guangxi Med Univ, 2023, 40(11): 1928-1932. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.11.024.
- [28] 朱吉凤, 孔超, 彭敏, 等. 石斛酚抑制内质网应激减轻大鼠角膜碱烧伤实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2025, 54(5): 590-595+601. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7377.2025.05.003.
Zhu JF, Kong C, Peng M, et al. Dendrobine inhibits endoplasmic reticulum stress to alleviate cornea alkali burn in rats[J]. Shaanxi Med J, 2025, 54(5): 590-595+601. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7377.2025.05.003.
- [29] Tang Y, Han Y, Zhao J, et al. A rational design of metal-organic framework nanozyme with high-performance copper active centers for alleviating chemical corneal burns[J]. Nanomicro Lett, 2023, 15(1): 112. DOI: 10.1007/s40820-023-01059-9.
- [30] Jiang T, Wang C, Chen Y. Tetramethylpyrazine inhibits keratitis and neovascularization induced by corneal alkali burn by suppressing the TLR4/NF- κ B pathway activation and NLRP1/NLRP3 inflammasomes in rats[J]. Exp Eye Res, 2023: 109704. DOI: 10.1016/j.exer.2023.109704.

(收稿日期:2025-07-04 修回日期:2025-12-22)

(本文编辑:骆世平 刘艳)