

# 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

王健, 解正高, 陈放, 朱俊, 杜伟

引用: 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. 国际眼科杂志 2020; 20(5): 782-786

作者单位: (225000) 中国江苏省扬州市, 苏北人民医院 扬州大学临床医学院

作者简介: 王健, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼外伤、角膜病。

通讯作者: 解正高, 博士, 主任医师, 研究方向: 眼外伤. zgxie87@163.com

收稿日期: 2019-08-27 修回日期: 2020-04-15

## 摘要

**目的:** 通过建立兔角膜碱烧伤模型, 比较自体血清与小牛血去蛋白眼用凝胶在兔角膜碱烧伤治疗中的效果。

**方法:** 制作兔右眼角膜碱烧伤模型 30 眼, 造模后碱烧伤程度全部为 III 度烧伤, 将其随机分为三组, 分别采用生理盐水、小牛血去蛋白眼用凝胶及自体血清滴眼液 4 次/d, 各组滴阿托品眼用凝胶 1 次/晚, 氧氟沙星眼用凝胶 1 次/晚, 连续 2wk。治疗 7、14d 后观察角膜新生血管形态并计算面积; 第 14d 处死各组实验动物后, 摘除双眼角膜, 其中左眼为正常对照, 右眼为实验眼, 分别进行常规组织病理学检查, 角膜组织匀浆内 CD45、IL-10、IFN- $\gamma$  及 VEGF 浓度测定。

**结果:** 治疗 7、14d 后小牛血去蛋白眼用凝胶组角膜新生血管面积 ( $29.48 \pm 2.27$ 、 $34.19 \pm 2.67 \text{mm}^2$ ) 与自体血清组 ( $34.19 \pm 2.67$ 、 $33.89 \pm 2.74 \text{mm}^2$ ) 无差异 ( $P > 0.05$ )。治疗 14d 角膜组织匀浆测定: 小牛血去蛋白眼用凝胶组 ( $0.56 \pm 0.04 \text{ng/mL}$ ) 和自体血清组 ( $0.54 \pm 0.05 \text{ng/mL}$ ) CD45 含量均小于生理盐水组 ( $1.27 \pm 0.07 \text{ng/mL}$ ) ( $P < 0.05$ ); 自体血清组 ( $452.49 \pm 11.40 \text{pg/mL}$ ) 和小牛血去蛋白眼用凝胶组 ( $332.49 \pm 13.67 \text{pg/mL}$ ) IL-10 含量均大于生理盐水组 ( $111.05 \pm 6.95 \text{pg/mL}$ ) ( $P < 0.05$ ); 小牛血去蛋白眼用凝胶组 ( $23.20 \pm 2.89 \text{pg/mL}$ ) 和自体血清组 ( $22.61 \pm 2.72 \text{pg/mL}$ ) IFN- $\gamma$  含量均小于生理盐水组 ( $41.77 \pm 4.26 \text{pg/mL}$ ) ( $P < 0.05$ ); 小牛血去蛋白眼用凝胶组 ( $151.14 \pm 18.21 \text{pg/mL}$ ) 和自体血清组浓度 ( $149.11 \pm 14.75 \text{pg/mL}$ ) VEGF 含量均小于生理盐水组 ( $391.35 \pm 28.59 \text{pg/mL}$ ) ( $P < 0.05$ )。

**结论:** 兔角膜碱烧伤后抑制炎症因子 CD45、IFN- $\gamma$  及 VEGF 释放及抑制角膜新生血管形成方面, 自体血清与小牛血去蛋白眼用凝胶作用相当; 在促进抗炎因子 IL-10 释放、抑制炎症细胞浸润方面, 自体血清作用强, 小牛血去蛋白眼用凝胶次之。

**关键词:** 角膜; 碱烧伤; 自体血清; 小牛血去蛋白眼用凝胶

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.5.08

## Comparison of autologous serum and deproteinised calf serum eye gel in the treatment of rabbit corneal alkali burn

Jian Wang, Zheng-Gao Xie, Fang Chen, Jun Zhu, Wei Du

Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225000, Jiangsu Province, China

**Correspondence to:** Zheng-Gao Xie. Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225000, Jiangsu Province, China. zgxie87@163.com

Received: 2019-08-27 Accepted: 2020-04-15

## Abstract

• **AIM:** To compare the effect of using autologous serum and deproteinised calf serum eye gel in the treatment of corneal alkali burn through establishing corneal alkali burn models.

• **METHODS:** Alkali burn model of cornea was established on the right eyes by putting the filter paper with 1.0mol/L NaOH on the center cornea for 1min in 30 white rabbits. The model rabbits were divided randomly into 3 groups after scoring based on Hughes criteria. Normal saline, calf blood deproteinized eye gel and autologous serum eye drops 4 times/day, atropine eye gel 1 times/night, ofloxacin eye gel 1 times/night for 2wk respectively. The morphology of corneal neovascularization was observed on the 7 and 14d, and the area was calculated. On the 14d, the corneas of each group were removed and routine histopathological examinations were performed according to the groups. The concentration of CD45, IL-10, IFN- $\gamma$  and VEGF in corneal homogenate were determined.

• **RESULTS:** Area of corneal neovascularization: on the 7 and 14d, the area of corneal neovascularization of Group DCS ( $29.48 \pm 2.27$ ,  $34.19 \pm 2.67 \text{mm}^2$ ), AS ( $34.19 \pm 2.67$ ,  $33.89 \pm 2.74 \text{mm}^2$ ) ( $P > 0.05$ ). Concentration of CD45, IL-10, IFN- $\gamma$ , VEGF in cornea homogenate (pg/mL): on the 14th day, the concentration of CD45 Group DCS ( $0.56 \pm 0.04 \text{ng/mL}$ ), AS ( $0.54 \pm 0.05 \text{ng/mL}$ ) < Group Ctrl ( $1.27 \pm 0.07 \text{ng/mL}$ ) ( $P < 0.05$ ). The concentration of IL-10 Group AS ( $452.49 \pm 11.40 \text{pg/mL}$ ) > Group DCS > ( $332.49 \pm 13.67 \text{pg/mL}$ ) > Group Ctrl ( $111.05 \pm 6.95 \text{pg/mL}$ ) ( $P < 0.05$ ). The Concentration of IFN- $\gamma$  Group DCS ( $23.20 \pm 2.89 \text{pg/mL}$ ), AS ( $22.61 \pm 2.72 \text{pg/mL}$ ) < Group Ctrl ( $41.77 \pm 4.26 \text{pg/mL}$ ). They have a significant difference ( $P < 0.05$ ). The concentration of VEGF Group DCS ( $151.14 \pm 18.21 \text{pg/mL}$ ),

AS ( $149.11 \pm 14.75 \text{ pg/mL}$ ) < Group Ctrl ( $391.35 \pm 28.59 \text{ pg/mL}$ ) ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** AS has the same effect as DCS in inhibiting the release of inflammatory factors (CD45, IFN- $\gamma$  and VEGF) and the formation of corneal neovascularization after alkali burn in rabbits, and AS has the strongest effect in promoting the release of anti-inflammatory factors (IL-10) and inhibiting the infiltration of inflammatory cells, followed by DCS.

• **KEYWORDS:** cornea; alkali burn; autologous serum; deproteinised calf serum eye gel

**Citation:** 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. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(5):782-786

## 0 引言

眼化学伤的发生约占眼外伤的10%左右,占整个工业性危害的5%~20%<sup>[1]</sup>。在各种化学伤中酸烧伤及碱烧伤占据主要地位,其中碱烧伤又因其病理机制复杂,并发症较多,预后较差,病程较长成为一类较为棘手的眼科疾病。角膜碱烧伤发生后,严重者留有永久视力损害,更甚者可以发生角膜溃疡、角膜穿孔、角膜白斑、干眼、睑球粘连、并发性白内障、继发青光眼、全眼球炎及眼球萎缩等<sup>[2]</sup>,是临床常见的致盲原因之一。

碱性物质具有强烈的刺激性和腐蚀性,其对角膜组织的损伤机制为:(1)碱性物质与组织接触后形成可溶于水的碱-变性蛋白复合物,皂化脂肪组织,从而发生组织液化性坏死,使碱性物质迅速向四周及深部组织扩散,腐蚀眼内其他组织,严重者可以损伤眼底等深部组织<sup>[3-4]</sup>。(2)碱烧伤后发生的炎症反应导致大量多核白细胞向创口移行浸润,而后释放大量的胶原酶及蛋白酶,进而使得胶原组织溶解,导致角膜溃疡,严重者形成角膜穿孔<sup>[5]</sup>。(3)中性粒细胞的组织内的浸润使得自由基产生增加,导致细胞膜的通透性增强,从而使得组织损害进一步加重。此三种机制相互联系,相互促进,从而导致角膜损坏的恶性循环<sup>[6-7]</sup>,轻者形成角膜云翳,严重者发生角膜白斑、无菌性角膜溃疡、穿孔、睑球粘连及继发青光眼等,留有永久性视力损害,严重者甚至无法保全眼球,导致失明。

目前角膜碱烧伤的药物治理主要有<sup>[2]</sup>:局部使用抗生素、散瞳、降眼压、肝素、胶原酶抑制剂、维生素C、枸橼酸钠、免疫抑制剂、表皮生长因子、纤维连接蛋白、基质金属蛋白酶抑制剂、转化因子- $\beta$ 、皮质类固醇激素、自体血清等。自体血清自1984年,Fox等<sup>[8]</sup>首先报道将自体血清用于治疗眼表疾病,其后广泛应用。小牛血去蛋白眼用凝胶其主要成分为20%小牛血去蛋白提取物,基质为卡波姆,含有多种游离氨基酸,低分子肽和寡糖,可以改善线粒体的呼吸功能<sup>[9]</sup>,增强细胞对葡萄糖及氧的利用,改善微循环及组织营养,促进ATP合成。小牛血去蛋白提取物眼用凝胶还能阻止碱烧伤组织的继发损害,防止损伤范围扩大与加深,促进角膜损伤的修复<sup>[10]</sup>。此外,其基质主要为卡波姆,有黏附性,能在局部形成保护膜,对受损角膜起保护作用,同时可以使得药效更持久<sup>[11]</sup>。二者在各类原因所致的角膜上皮缺损的治疗中应用广泛,已有大量临床文

献报道,但二者在角膜碱烧伤中的疗效比较鲜有报道,尤其是在动物实验方面。

本实验以兔角膜碱烧伤为实验模型,分别观察局部使用自体血清、小牛血清去蛋白眼用凝胶及生理盐水等滴眼液后兔角膜碱烧伤的角膜组织病理学改变、角膜新生血管情况以及炎症因子浓度,分析不同组别在角膜碱烧伤治疗过程中疗效的差异。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 **实验动物** 健康大耳白兔30只(由扬州大学医学院实验动物中心提供),体质量2.0~2.5kg,雄雌不限,眼部检查无异常。实验方案获院伦理委员会审批通过。30只兔角膜碱烧伤造模并进行烧伤分度全部为Ⅲ度后通过随机数字表法分为3组,生理盐水组,小牛血去蛋白眼用凝胶组、自体血清组。每组各10只,每组各只兔分别编号(组号-个号)。

1.1.2 **主要试剂及仪器** 小牛血去蛋白眼用凝胶、阿托品凝胶、氧氟沙星眼膏(沈阳兴齐制药有限公司),兔自体血清滴眼液(自制),兔白细胞共同抗原(CD45)、兔 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )、兔白细胞介素-10(IL-10)、兔血管内皮细胞生长因子(VEGF)酶联免疫吸附测定试剂盒(上海瑶韵生物科技股份有限公司)。眼前节照相机(科林公司),Image-Pro PLUS 6.0图像处理软件(Media Cybernetics公司),扫描电镜(美国FEI公司,XL-30),酶标仪(瑞士TETCAN公司,TECAN SUNRISE)。

### 1.2 方法

1.2.1 **建立兔角膜碱烧伤模型** 将眼部检查无异常的大耳白兔30只,每只右眼用0.5%盐酸丙美卡因滴眼液表面麻醉3次,每次间隔2min。开睑器开睑,无菌生理盐水冲洗结膜囊,以灭菌棉签擦净结膜囊,将直径为8mm的灭菌滤纸片浸入1.0mol/L的NaOH溶液中饱和后吸去多余碱液,后将滤纸片置于兔右眼中央角膜表面1min后取出,立即用灭菌生理盐水连续冲洗5min,形成边界清晰的圆形白色烧伤区域,制作成兔角膜碱烧伤动物模型。依据Hughes分度法为中度碱烧伤<sup>[12]</sup>。依据我国1982年眼外伤与职业性眼病协作小组通过的分度标准<sup>[1]</sup>为Ⅲ度烧伤。

1.2.2 **制作兔自体血清滴眼液** 于角膜碱烧伤造模分组后将自体血清组各只实验兔,用离心管分别采集各兔两耳耳缘静脉血约10mL,置清洁无菌离心试管中,室温下静置2h后以3000r/min离心10min,取上清血清液分别注入有各只实验兔对应标号的2只无菌滴眼液空瓶中,置于4℃冰箱内避光保存备用。1wk后弃去先使用的第1支残液,使用第2支自体血清。

1.2.3 **给药方式** 各组实验兔右眼造模后分别以无菌生理盐水滴眼液、小牛血去蛋白眼用凝胶、自体血清滴眼液滴右眼,每次2滴,每次停留30s以上,4次/d;同时所有实验兔右眼每晚使用阿托品凝胶及氧氟沙星眼膏涂眼1次,连续14d。

1.2.4 **测定角膜新生血管面积** 将所有实验白兔按组及编号分别于造模后7、14d裂隙灯下观察角膜4个象限最长一支新生血管长度、累及角膜缘钟点数等情况,按文献公式进行计算各象限新生血管面积(CRNV)。公式: $A = C/12 \times 3.1416[r^2 - (r-1)^2]$ 。C为CRNV累及角膜圆周钟

点数,  $l$  为所取血管长度,  $r$  为兔角膜半径 6.75mm, 总面积等于 4 个象限之和。

**1.2.5 测定角膜组织匀浆 CD45、IL-10、IFN- $\gamma$  及 VEGF 含量** 第 14d 用空气栓塞法处死各组实验动物, 摘取双眼, 每组左眼作为健眼对照。按编号分别取部分角膜组织, 用预冷的 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲净残留其上的血液, 称量后将组织剪碎。将剪碎的角膜组织与 PBS 按  $m(\text{角膜组织}):V(\text{PBS})=1:9$  的比例加入玻璃匀浆器中, 于冰上充分研磨。对匀浆液进行超声破碎。将匀浆液于 5000 $\times$ g 离心 10min, 取上清使用 IL-10、CD45、IFN- $\gamma$  及 VEGF 的 ELISA 试剂盒按步骤进行检测。

**1.2.6 角膜组织病理学检查** 将摘除的各组及随机摘取的健眼部分角膜, 常规甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 苏木精-伊红染色, 100 倍显微镜下进行组织学观察。

统计学分析: 所有数据均由 SPSS 25.0 统计软件处理, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。经 W 检验判断是否呈正态分布, 经 Levene 检验方差齐性。角膜新生血管面积及角膜组织匀浆 CD45、IL-10、IFN- $\gamma$  及 VEGF 测定结果比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验。  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 治疗 7d 和 14d 后三组兔角膜新生血管面积比较** 治疗 7、14d 后三组兔角膜新生血管面积比较差异均有统计学意义 ( $P=0.001$ )。治疗 7、14d 后小牛血清去蛋白眼用凝胶组、自体血清组新生血管面积均小于生理盐水组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 小牛血清去蛋白眼用凝胶组与自体血清组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见表 1、2。

**2.2 治疗 14d 后三组兔角膜组织匀浆 CD45、IL-10、IFN- $\gamma$  及 VEGF 含量比较** 治疗 14d 后三组兔角膜组织匀浆 CD45、IL-10、IFN- $\gamma$  及 VEGF 含量比较差异均有统计学意义 ( $P=0.001$ )。CD45 含量小牛血清去蛋白眼用凝胶组、自体血清组小于生理盐水组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); IL-10 含量自体血清组大于小牛血清去蛋白眼用凝胶组和生理盐水组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); IFN- $\gamma$  含量小牛血清去蛋白眼用凝胶组、自体血清组小于生理盐水组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); VEGF 含量小牛血清去蛋白眼用凝胶组、自体血清组小于生理盐水组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 表 3、4。

**2.3 治疗 14d 后角膜组织病理学检查** 正常角膜组: 角膜上皮完整, 基质纤维排列规则, 无水肿及充血, 无炎性细胞浸润; 生理盐水组: 角膜上皮断裂, 基质纤维排列不规则, 基质纤维水肿及大量炎性细胞浸润; 小牛血清去蛋白眼用凝胶组: 角膜上皮完整, 基质纤维排列基本规则, 基质纤维轻度水肿及中等量炎性细胞浸润; 自体血清组: 角膜上皮完整, 基质纤维排列基本规则, 基质纤维轻度水肿及少量炎性细胞浸润, 见图 1。

## 3 讨论

角膜化学烧伤严重危害眼组织, 临床上除早期的急诊相关处理外, 多采取抗炎、抑制免疫反应<sup>[13]</sup>、角膜移植术、基因治疗等手段, 治疗效果各有优缺点<sup>[14]</sup>, 而角膜组织修复也是疾病药物治疗的关键环节, 维持及恢复角膜表层及内皮层的正常细胞代谢是角膜损伤愈合的先决条件。化学致伤物的种类、化学性质、物理性质、穿透组织的能力、

表 1 治疗 7d 和 14d 后三组兔角膜新生血管面积比较

| 分组           | $(\bar{x}\pm s, \text{mm}^2)$ |                  |
|--------------|-------------------------------|------------------|
|              | 治疗 7d                         | 治疗 14d           |
| 生理盐水组        | 46.18 $\pm$ 3.69              | 49.24 $\pm$ 3.83 |
| 小牛血清去蛋白眼用凝胶组 | 29.48 $\pm$ 2.27              | 34.19 $\pm$ 2.67 |
| 自体血清组        | 34.19 $\pm$ 2.67              | 33.89 $\pm$ 2.74 |
| <i>F</i>     | 56.631                        | 41.519           |
| <i>P</i>     | 0.001                         | 0.001            |

浓度、接触时间和面积, 伤后是否接受合理的急救处理等因素影响化学性眼表烧伤的程度和预后。角膜碱烧伤比酸烧伤严重, 主要因为其病理机制复杂, 并发症多, 预后最差<sup>[15]</sup>, 不仅是眼科的急症重症, 也是眼科的疑难病症, 是眼部致残致盲的常见原因之一。

小牛血清去蛋白眼用凝胶是小牛血清去蛋白提取物的眼用制剂, 主要含有无机离子 ( $K^+$ 、 $Cl^-$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  等) 及氨基酸、小分子肽、核苷酸、低聚糖、脂类等小分子有机物, 其中的小分子活性物质能改善组织细胞对氧和葡萄糖的摄取及利用, 还能促进成纤维细胞和内皮细胞的游走和增生, 因而能够促进创伤愈合<sup>[16-17]</sup>。有研究表明在角膜碱烧伤的药物疗法中, 其能阻止角膜继发性损害, 从而防止组织损伤范围扩大及加深, 促进损伤角膜组织的修复<sup>[10]</sup>。同时它不含蛋白, 较少引起过敏。此外, 其基质主要为卡波姆, 有黏附性, 能在局部形成保护膜, 对受损角膜起保护作用, 同时可以使得药效更持久<sup>[11]</sup>。

自体血清即从患者自己的血液中所提取的血清, 去除了血液中的细胞成分和凝血因子, 含有氨基酸、维生素、无机盐、脂质, 蛋白质以及大量的活性因子。包含了几乎所有生理泪液的成分, 与泪液的生物力学和生物化学特性也较为相似<sup>[18]</sup>, pH 值和渗透压也相近, 其中纤维连接蛋白、维生素 A 以及表皮生长因子含量甚至高于正常泪液<sup>[18]</sup>。1984 年, Fox 等<sup>[8]</sup> 首先报道将自体血清用于治疗眼表疾病。自体血清为自身来源, 无过敏反应, 机体耐受性较好, 患者使用需要采集自身血液。临床使用过程中需要注意只能采集碱烧伤后 1wk 内的血清方可使用, 因为 1wk 后机体产生自身抗体, 反而不利于组织修复。碱烧伤后角膜中蛋白变性而成为抗原, 扩散进入角膜和结膜组织, 由于该区域具有“局部淋巴结”作用而产生免疫应答, 同时抗原通过角结膜血管进入血液循环或淋巴循环, 进而刺激机体免疫器官产生相应抗体<sup>[2]</sup>。

实验研究表明: (1) 角膜新生血管面积形成方面: 正常角膜内无血管是维持角膜组织透明及免疫赦免的必要条件, 缺氧、炎症、感染及外伤等均可诱发角膜新生血管。角膜碱烧伤易诱导新生血管形成<sup>[19-20]</sup>。角膜碱烧伤后新生血管为形成因子与抑制因子平衡失调的结果, 角膜内调节因子在角膜新生血管形成中具有重要作用<sup>[21]</sup>, 新生血管虽可促进组织修复, 但会影响角膜透明度, 最终影响视功能<sup>[22]</sup>。VEGF 是目前确定的一种最直接的新生血管形成因子, 碱烧伤后角膜组织内大量 VEGF 表达使血管内皮细胞分裂、增生和迁移, 毛细血管基底膜发生降解, 形成新生血管腔。治疗 7、14d 后小牛血清去蛋白眼用凝胶组、自体血清组新生血管面积小于生理盐水组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。小牛血清去蛋白眼用凝胶组、自体血清组

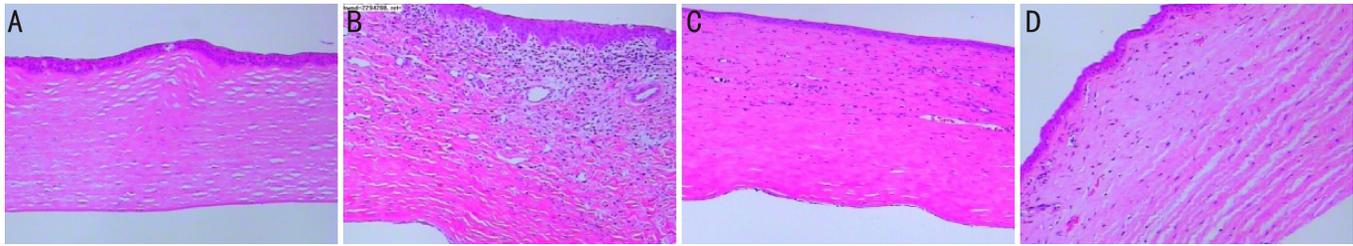


图 1 各组角膜组织病理学检查图片 (HE×100) A:正常角膜组;B:生理盐水组;C:小牛血去蛋白眼用凝胶组;D:自体血清组。

表 2 治疗 7d 和 14d 后三组兔角膜新生血管面积组间两两比较统计值

| 组间两两比较               | 治疗 7d   |       | 治疗 14d |       |
|----------------------|---------|-------|--------|-------|
|                      | t       | P     | t      | P     |
| 生理盐水组 vs 小牛血去蛋白眼用凝胶组 | 16.7033 | 0.001 | 15.213 | 0.001 |
| 生理盐水组 vs 自体血清组       | 17.1883 | 0.001 | 15.378 | 0.001 |
| 小牛血去蛋白眼用凝胶组 vs 自体血清组 | 0.485   | 0.962 | 0.165  | 0.996 |

表 3 治疗 14d 后三组兔角膜组织匀浆 CD45、IL-10、IFN-γ 及 VEGF 含量比较

| 分组          | CD45 (ng/mL) | IL-10 (pg/mL) | IFN-γ (pg/mL) | VEGF (pg/mL) | $\bar{x} \pm s$ |
|-------------|--------------|---------------|---------------|--------------|-----------------|
| 生理盐水组       | 1.27±0.07    | 111.05±6.95   | 41.77±4.26    | 391.35±28.59 |                 |
| 小牛血去蛋白眼用凝胶组 | 0.56±0.04    | 332.49±13.67  | 23.20±2.89    | 151.14±18.21 |                 |
| 自体血清组       | 0.54±0.05    | 452.49±11.40  | 22.61±2.72    | 149.11±14.75 |                 |
| F           | 402.094      | 1733.607      | 101.638       | 219.863      |                 |
| P           | 0.001        | 0.001         | 0.001         | 0.001        |                 |

表 4 治疗 14d 后三组兔角膜组织匀浆 CD45、IL-10、IFN-γ 及 VEGF 含量两两比较统计值

| 组间两两比较               | CD45 |        | IL-10  |        | IFN-γ  |        | VEGF   |        |
|----------------------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                      | t    | P      | t      | P      | t      | P      | t      | P      |
| 生理盐水组 vs 小牛血去蛋白眼用凝胶组 | 0.71 | <0.001 | 221.43 | <0.001 | 18.56  | <0.001 | 240.21 | <0.001 |
| 生理盐水组 vs 自体血清组       | 0.73 | <0.001 | 341.44 | <0.001 | 19.161 | <0.001 | 242.24 | <0.001 |
| 小牛血去蛋白眼用凝胶组 vs 自体血清组 | 0.01 | 0.576  | 120.00 | <0.001 | 0.59   | 0.753  | 2.03   | 0.997  |

角膜新生血管面积相当,显著小于生理盐水组,主要是因为二者都含有来源于血液中的大量有效的活性成分,能够抑制角膜炎症及减少新生血管形成。(2)角膜组织匀浆 CD45、IL-10、IFN-γ 及 VEGF 浓度:治疗 14d 角膜匀浆测定;CD45 浓度小牛血去蛋白眼用凝胶组、自体血清组小于生理盐水组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );IL-10 浓度自体血清组大于小牛血去蛋白眼用凝胶组大于生理盐水组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );IFN-γ 浓度小牛血去蛋白眼用凝胶组、自体血清组小于生理盐水组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );VEGF 浓度小牛血去蛋白眼用凝胶组、自体血清组小于生理盐水组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。角膜碱烧伤后炎症反应在角膜组织损伤中起着重要的作用,其中各种炎症因子又在这一过程中发挥重要的作用。CD45 是位于白细胞表面的白细胞共同抗原 (LCA),高水平表达在除红细胞和血小板之外的多有造血细胞上。在 B 细胞和 T 细胞的不同发育阶段,CD45 参与多种免疫功能<sup>[23]</sup>。IFN-γ 具有抗病毒、免疫调节及抗肿瘤特性,同时还能促成自身免疫。碱烧伤后两组 CD45 及 IFN-γ 浓度小于生理盐水组,表明自体血清与小牛血去蛋白眼用凝胶组在炎症因子形成释放过程中有一定抑制作用。IL-10 是一种多细胞源、多功能的细胞因子,调节细胞的生长与分化,参与炎症反应和免疫反应,是目前公认的炎症与免疫抑制因子,能够抑制巨噬细胞释放炎症介

质。Sotozono 等<sup>[24]</sup>研究发现,角膜碱烧伤后 IL-1, IL-6, IL-10, TNF-α 的 mRNA 表达增高。IL-10 浓度自体血清组最高,小牛血去蛋白眼用凝胶组次之,表明自体血清在抑制炎症过程中能够促进淋巴细胞释放抑制炎症的因子,其效果优于小牛血去蛋白眼用凝胶组。VEGF 是一种很强的内皮细胞有丝分裂原,可增加血管的通透性,刺激血管内皮细胞的增殖<sup>[25]</sup>,是目前确定的一种最直接的新生血管形成因子,其过度表达和新生血管形成密切相关<sup>[26]</sup>。新生血管一方面可以促进角膜修复,但也可以影响角膜透明度。在各组中自体血清组与小牛血去蛋白眼用凝胶组 VEGF 浓度较低,这与二者角膜新生血管面积有对应关系。有报道提示抑制 VEGF 的表达可以抑制角膜新生血管形成<sup>[27-28]</sup>。(3)角膜组织病理学方面:治疗 14d 角膜常规病理检查:正常角膜组,角膜上皮完整,基质纤维排列规则,无水肿及充血,无炎性细胞浸润;碱烧伤后角膜上皮断裂,基质纤维排列紊乱,基质纤维水肿及炎性细胞浸润。治疗 14d 后自体血清组与小牛血去蛋白眼用凝胶组二者比较,上皮基本修复,基质纤维排列较其规则,炎症细胞浸润较少,炎症细胞较少可使得自由基产生减少,减少胶原溶解,从而减轻组织炎症反应。

根据文献报道使用自体血清时应注意时机,应使用伤后 1wk 内的血清<sup>[2]</sup>。刘春明<sup>[29]</sup>实验证明碱烧伤 7d 后自体血中可以检测出抗体,5~6wk 达高峰,随后逐渐下降。

在抑制炎症因子释放、角膜新生血管形成、抑制炎症细胞浸润方面,自体血清与小牛血去蛋白眼用凝胶作用相当。因此,在碱烧伤治疗的早期,如果能够采集自体血清用于治疗效果较为理想,其富含多种营养物质,在角膜上皮及基质修复方面有良好效果,不仅能有效降低泪液中炎症因子浓度<sup>[30]</sup>,同时还能降低角膜组织中炎症因子浓度。自体血清采集时注意无菌,以减少污染可能,根据 Tsubota 等<sup>[31]</sup>研究在 4℃ 避光保存 1mo 及 -20℃ 保存 3mo 时其主要有效成分 (EGF, 维生素 A, TGF-β) 浓度无显著改变。关于自体血清不同浓度的对比研究较少,有报道高浓度可能效果更好<sup>[32]</sup>。如果没有条件使用或伤后已逾 1wk 则优先考虑使用小牛血去蛋白眼用凝胶。本研究着重观察了在角膜碱烧伤后早期自体血清与小牛血去蛋白眼用凝胶二者主要区别,未能对中晚期疗效进行全面比较,有待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 李凤鸣. 中华眼科学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社 2005; 3159-3166
- 2 刘祖国. 眼表疾病学. 北京: 人民卫生出版社 2003; 499-655
- 3 Paschalis EI, Zhou C, Lei F, et al. Mechanisms of retinal damage after ocular alkali burns. *Am J Pathol* 2017; 187(6): 1327-1342
- 4 Dohlman CH, Cade F, Regatieri CV, et al. Chemical Burns of the Eye: The Role of Retinal Injury and New Therapeutic Possibilities. *Cornea* 2018; 37(2): 248-251
- 5 Kenyon KR, Berman M, Rose J, et al. Prevention of stromal ulceration in the alkali-burned rabbit cornea by glued-on contact lens. Evidence for the role of polymorphonuclear leukocytes in collagen degradation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979; 18(7): 570-574
- 6 Waqoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997; 141(4): 275-313
- 7 Connors MS, Urbano FM, Vafaei C, et al. Alkali burn - induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(10): 1963-1971
- 8 Fox RI, Chan R, Michelson JB, et al. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheumatol* 1984; 27(4): 459-461
- 9 Kuninaka T, Senga Y, Senga H, et al. Nature of enhanced mitochondrial oxidative metabolism by a calf blood extract. *J cell Physiol* 1991; 146(1): 148-155
- 10 Groot H, Brecht M, Machica F. Evidence for a factor protective against hypoxic liver parenchymal cell injury in a protein-free blood extract. *Res Commun Chem Pharmacol Pathol Pharmacol* 1990; 68(1): 125-128
- 11 Kranning HM, Rohd-Germann H, Straub W. Therapy of corneal erosions and 'dry eye' with scopolamine and vitasec eye drops. *Ophthalmologica* 1989; 199(2-3): 100-105
- 12 Chung JH, Kang YG, Kim HJ. Effect of 0.1% dexamethasone on epithelial healing in experimental corneal alkali wounds: morphological changes during the repair process. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236(7): 537-545

- 13 幸正茂, 刘菲, 袁进. 角膜碱烧伤的免疫学机制研究进展. *眼科研究* 2010; 28(8): 796-800
- 14 王光进, 张悦. 眼表化学烧伤的早期治疗研究进展. *实用医院临床杂志* 2010; 7(3): 102-105
- 15 Jiang N, Ma MY, Li YY, et al. The role of pirfenidone in alkali burn rat cornea. *Int Immunopharmacol* 2018; 64(11): 78-85
- 16 Magakian YA, Karalyan ZA, Karalova EM, et al. Comparative multiparametric analysis of HeLa and RD cell culture reactions to solcoseryl. *Bull Exp Biol Med* 2009; 148(4): 615-618
- 17 Egorov EA, Kalinin NI, Kiiasov AP. New stimulants of corneal reparative Regeneration. *Vestn Ophthalmolog* 1999; 115(6): 13-15
- 18 Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004; 88(11): 1467-1474
- 19 Iwona BS. Growth factors in pathogenesis of retinal neurodegeneration in diabetes mellitus Affiliation. *Curr Neuropharmacol* 2016; 14(9): 125-129
- 20 Dziadosz M, Basch RS, Young BK. Human amniotic fluid; a source of stem cells for possible therapeutic use. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214(3): 321-327
- 21 王群, 姜严明, 赵杰, 等. 血管内皮生长因子靶向抗体对大鼠角膜碱烧伤后新生血管抑制作用的研究. *眼科新进展* 2017; 37(11): 1010-1014
- 22 冯璐, 狄国虎, 周庆军, 等. 血管内皮生长因子及其受体家族在角膜组织及角膜病变中的作用和研究进展. *中国组织工程研究* 2016; 20(11): 1644-1650
- 23 李思思, 汤永民. CD45 分子结构和功能研究进展. *国际免疫学杂志* 2008; 31(5): 346-349
- 24 Sotonozo C, He J, Matsumoto Y, et al. Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Curr Eye Res* 1997; 16(7): 670-676
- 25 Shi C, Guo Y, Lv Y, et al. Clinicopathological features and prognosis of papillary thyroid microcarcinoma for surgery and Relationships with the BRAFV600E Mutational Status and Expression of Angiogenic Factors. *PLoS One* 2016; 11(12): 16-24
- 26 Liu J, Ji Z, Huang L, et al. Xuefuzhuyu Tang exerts antitumor effects by inhibiting glioma cell metastasis and invasion via regulating tumor microenvironment. *Oncotargets Ther* 2016; 9(1): 360-361
- 27 Miller I, Chuderland D, Grossman H, et al. The dual role of PEDF in the pathogenesis of OHSS: negating both angiogenic and inflammatory pathways. *Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(12): 16-19
- 28 Yu YJ, Mo B, Liu L, et al. Inhibition of choroidal neovascularization by lentivirus-mediated Pedf gene transfer in rats. *Int J Ophthalmol* 2016; 9(8): 12-20
- 29 刘春明. 角膜碱烧伤血清特异性抗体的变化特征. *眼科研究* 1998; 16(4): 248-250
- 30 车敬斌, 田甜, 张加斌, 等. 自体血清联合重组人表皮生长因子对角膜创面的修复作用. *国际眼科杂志* 2019; 19(4): 619-622
- 31 Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999; 83(4): 390-395
- 32 查志伟, 陈梅珠. 不同浓度自体血清滴眼液在眼表疾病中的应用. *中国实用眼科杂志* 2017; 35(5): 456-459