论著

文章编号:1000-5404(2006)06-0580-04

诺帝滴眼液对碱烧伤诱导角膜新生血管的抑制作用

刘丹宁[1],谢汉平[1],卞修武[2],王章阳[3],殷 旭[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军眼科中心,[2]病理学研究所,[3]药剂科,重庆 400038)

提 要:目的 观察自制诺帝滴眼液(Nordy eye drop)对Long-Evans大鼠角膜碱烧伤后新生血管(CRNV)有无抑制作用及其对正常角膜有无毒副作用。**方法** 采用0.025%、0.1%两个不同浓度诺帝滴眼液滴眼21 d,通过裂隙灯、光镜、电镜观察检测诺帝滴眼液的毒副作用。建立角膜碱烧伤后角膜新生血管模型,0.025%、0.1%两个不同浓度诺帝滴眼液4次/d滴眼治疗,0.1%地塞米松磷酸钠滴眼液作为阳性对照、空白溶液作为阴性对照,观察诺帝治疗效果。**结果** 诺帝滴眼液滴眼21 d后观察正常大鼠,无畏光、结膜充血等刺激症状,组织学检查显示结构正常,未见炎性细胞浸润。大鼠角膜碱烧伤后1 d时仅见角膜缘血管网扩张,3 d时新生血管长入,7~14 d达高峰,14 d时治疗组和地塞米松组新生血管开始退化;比较各组CRNV面积与角膜面积的比值,治疗组和阳性对照组均小于阴性对照组并有非常显著性差异($P<0.01$),治疗组与阳性对照组间、0.025%与0.1%治疗组间均无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 0.025%、0.1%的诺帝滴眼液局部滴眼无明显毒副作用,并且对CRNV有显著抑制作用。

关键词:诺帝;角膜;新生血管;碱烧伤

中图法分类号:R643;R772.2;R988.1 **文献标识码**:A

Inhibitory effect of Nordy eye drop on rat corneal neovascularization induced by alkali cauterization

LIU Dan-ning[1], XIE Han-ping[1], BIAN Xiu-wu[2], WANG Zhang-yang[3], YIN Xu[1] ([1]Department of Ophthalmology, [2]Department of Pathology, [3]Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of Nordy eye drops on corneal neovascularization of Long-Evans rats induced by alkali cauterization and to observe the adverse effect of Nordy eye drops on the cornea of normal rats. **Methods** After topical application of 0.025%, 0.1% Nordy eye drops on normal rats' cornea for 21 d, the toxicity effects and side effects were observed by slit-lamp biomicroscope, light microscope and electron microscope. Rat corneal neovascularization models were made by applying a filter paper of 3.5 mm in diameter soaked of 1 mol/L NaOH solution to the center of cornea for 90 s, and then respectively given 0.025%, 0.1% Nordy eye drops, 0.1% Dexamethasone sodium phosphate eye drops as the positive control, or Nordy solvent as the negative control 4 times per day. The corneal neovascularization was observed by slit-lamp biomicroscope and the ratio of corneal neovascularization area to corneal area was caculated. **Results** No photophobia, conjunctival congestion and erosion of corneal epithelium were observed after topical application of 0.025% or 0.1% Nordy eye drops on normal rat cornea. The rat corneal neovascularization induced by alkali cauterization was significantly suppressed after local application of the Nordy eye drops as compared with negative control group ($P<0.01$), but no difference between Nordy eye drops group and positive group ($P>0.05$) or between 0.025% and 0.1% Nordy eye drops groups ($P>0.05$). **Conclusion** The rat corneal neovascularization induced by alkali cauterization can be significantly inhibited by local application of 0.025%, 0.1% Nordy eye drops that have no toxicity and adverse effect.

Key words: Nordy; cornea; neovascularization; alkali burn

正常角膜组织的无血管化保证了角膜的透明性。角膜新生血管(corneal neovascularization, CRNV)是在创伤、炎症、感染、手术以及变性等情况下生成的病理性后果,是角膜盲形成的重要因素。因此,抗CRNV发生及治疗对恢复视力、提高手术成功率具有重要意义。局部应用糖皮质激素是目前临床上的主要治疗手段,但其存在易发生角膜穿孔、诱发青光眼等严重并发症。我们前期合成的诺帝(Nordy)是天然形成的去甲

作者简介:刘丹宁(1976-),女,辽宁省鞍山市人,硕士研究生,医师,主要从事角膜碱烧伤后新生血管防治方面的研究。电话:(023)65398617

通讯作者:卞修武,电话:(023)68752247

收稿日期:2005-11-10;修回日期:2006-01-04

二氢愈创木酸（nordihydroguaiareticacid，NDGA）类化合物，具有抗肿瘤性及抗非肿瘤性血管生成作用[1,2]，本实验采用碱烧伤实验模型诱发 Long-Evans 大鼠 CRNV，就诺帝滴眼液的给药浓度、毒副作用、药物抗 CRNV 作用等进行实验性研究。

1　材料与方法

1.1　实验动物

取健康成年 Long-Evans 大鼠 23 只（46 眼），雌雄不限，体质量为 250～300 g。购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心，符合国家医用动物使用标准，生产许可证号 SCXK（渝）2002-002。

1.2　诺帝滴眼液研制

取相应剂量的诺帝（由第三军医大学西南医院病理学研究所提供，纯度为 99.9%）配制成 0.1%、0.025% 质量浓度的诺帝滴眼液（滴眼液浓度根据前期体外实验剂量及预实验剂量摸索而定），调 pH 值 7.2～7.4，渗透压比为 0.9～1.1（与 0.9% 氯化钠溶液的相对之比），微孔滤膜过滤除菌，经高压液相分析滴眼液中诺帝结构稳定，制药及检测全过程在第三军医大学西南医院药剂科完成。

1.3　诺帝滴眼液的药物毒副作用研究

1.3.1　分组　　取 7 只大鼠（14 眼）分为Ⅰ组（0.025% 诺帝滴眼液组，n=4 眼），Ⅱ组（0.1% 诺帝滴眼液组，n=4 眼），Ⅲ组（空白溶液组，n=4 眼），Ⅳ组（正常角膜组，n=2 眼）。各组大鼠在裂隙灯显微镜下检查大鼠眼角膜透明，并用 1% 荧光素钠行角膜染色，观察角膜上皮情况、照相，Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组分别给予相应眼液滴眼，4 次/d（8:30，12:30，16:30，20:30），每次 1 滴，约 10 μl，共 21 d。第 21 天时裂隙灯显微镜检查大鼠眼角膜情况，并用 1% 荧光素钠行角膜染色、照相。

1.3.2　组织病理学观察　　过量 10% 水合氯醛腹腔注射处死大鼠，迅速剜出眼球，于显微镜下剪下带 1 mm 宽巩膜的角膜组织，轻轻剥除虹膜组织，取 1/2 角膜于 20% 中性甲醛中固定，48 h 后取出，常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、HE 染色。

1.3.3　透射电镜观察　　另 1/2 角膜组织于显微镜下剪成 1 mm×2 mm 大小组织块，置于 2.5% 戊二醛固定液中固定，4 ℃，2 h 以上，1% 锇酸固定 2 h，4 ℃下进行；经脱水、置换、包埋、定位，LKB 超薄切片机制作 50～60 nm 的超薄切片，饱和－醋酸铀、枸橼酸铅双染色。

1.4　诺帝滴眼液抑制角膜新生血管作用观察

1.4.1　角膜碱烧伤动物模型制备　　取 16 只（共 32 眼）大鼠用 10% 水合氯醛（0.35 ml/100 g）腹腔内注射麻醉后，在裂隙灯显微镜下检查大鼠眼角膜透明，用 0.4% 的奥布卡因滴眼 2 次，行表面麻醉，将直径为 3.5 mm 圆形滤纸片（3.5 mm 环钻钻取）浸入 1 mol/L 氢氧化钠溶液内约 10 s，取出后用滤纸吸去过多碱液，然后将滤纸片贴敷于角膜中央，90 s 后取下，立即用 0.9% 生理盐水彻底冲洗烧伤区及结膜囊 1 min，涂红霉素及阿托品眼膏预防感染及扩瞳预防虹膜后粘连。伤后 3 d 给予 0.25% 氯霉素滴眼液滴眼，4 次/d。

1.4.2　分组　　实验大鼠分为 4 组，其中 A 组（空白溶液组，n=8 眼）、B 组（0.025% 诺帝滴眼液治疗组，n=8 眼）、C 组（0.1% 诺帝滴眼液治疗组，n=8 眼）、D 组（0.1% 地塞米松磷酸钠滴眼液阳性对照组，n=8 眼）。各组均于碱烧伤后立即局部滴眼，4 次/d（滴眼时间同前），每次 1 滴，共 21 d。

1.4.3　CRNV 观察与测量　　于伤后第 3、7、14 天用裂隙灯显微镜观察，每只眼球于上、下、左、右 4 个方位拍摄侧面照片，采用 Image-Pro plus4.5 图像处理软件，在输入计算机的每只角膜照片上随机选取图像清晰部分，测定角膜扇形面积及其中新生血管的面积，取 4 个方位的角膜新生血管均值与角膜扇形面积均值，计算 CRNV 面积与角膜面积比。穿孔、感染角膜除外。

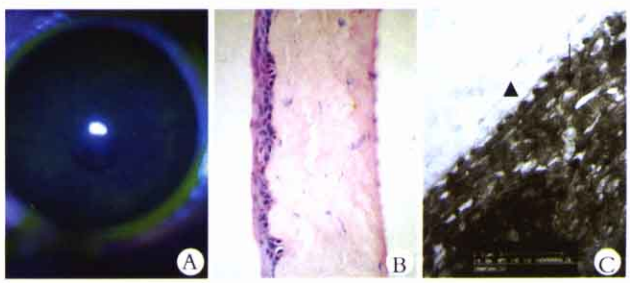
1.5　统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计包进行单因素方差分析检验。

2　结果

2.1　诺帝滴眼液毒副作用检测结果

对Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组大鼠分别进行滴眼后行为观察及裂隙灯、光镜、电镜观察。结果显示滴眼初期各组个别大鼠偶有轻微挠抓动作，1 周后均消失，未见畏光、充血等不适症状，21 d 时行 1% 荧光素钠染色未见角膜上皮缺损、角膜混浊，未见眼睑、结膜水肿及其他并发症。与Ⅳ组对比，HE 染色光镜观察，Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组角膜上皮细胞完整，基质排列规则，未见炎症细胞。透射电镜检查：角膜上皮细胞器及细胞核结构正常，基底膜结构完整，基质层胶原纤维排列整齐，未见炎症细胞，见图 1。



A：行 1% 荧光素钠染色；B：HE 切片（×400）；C：超微结构（TEM ×14 000）；↑：角膜上皮细胞；▲：角膜基质胶原纤维

图 1　0.1% 诺帝滴眼液滴眼 21 d 后的大鼠角膜检测

2.2　碱烧伤后角膜形态及新生血管观察

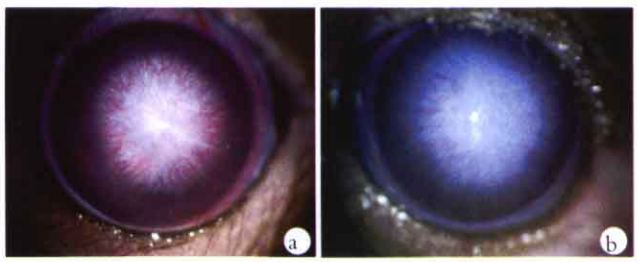
碱烧伤后 1 d 时：A、B、C、D 组均仅见角膜缘血管网扩张，无新生血管长入，角膜水肿均较重，看不到瞳孔。

碱烧伤后 3 d 时：各组均开始有新生血管长入，A 组 CRNV 已长入角膜烧灼区，新生血管粗而密集，几乎无法分辨血管形态、色红，有血管网形成；B 组 CRNV 较 A 组短，血管未到达烧灼区，末梢血管有交联；C、D 组仅见新生血管芽长出，血管芽细小稀疏，色淡。A 组角膜水肿明显，无法窥清瞳孔，中央角膜上皮缺损区较大，角膜溃疡深达前基质层，B、C、D 组角膜混浊水肿有所减轻，可隐约看见瞳孔，B、C 组角膜上皮缺损区有所缩小，但 D 组角膜上皮缺损区大，角膜溃疡明显，达前基质层。

碱烧伤后 7 d 时：A 组新生血管生长达高峰，血管粗大密集，交织成网；B、C、D 组新生血管增长较 A 组缓慢，血管稀疏，

较细。A 组角膜上皮基本愈合;B、C 组角膜上皮已修复,角膜表面光滑;D 组中央角膜溃疡明显,角膜上皮修复不佳;C 组 1 眼感染,排除在外。

碱烧伤后 14 d 时:A 组新生血管达角膜中央,血管密集,粗大;D 组新生血管细小,周边大部分新生血管退化,留有粗大血管;B、C 组血管多数尚未达角膜中央,周边部分细小新生血管有所退化,血管细小,色淡,稀疏,见图 2。此时期 A、B、C 组角膜上皮均修复,溃疡愈合; D 组部分角膜中央变薄。有 2 眼穿孔,排除在外。



a: A 组(空白溶液组); b: C 组(0.1% 诺帝滴眼液治疗组)

图 2 碱烧伤后 14 d 大鼠角膜新生血管生长情况

2.3 CRNV 面积与角膜面积比值的比较

角膜碱烧伤后 3、7、14 d, A、B、C、D 组 CRNV 面积与自身角膜面积之比值行单因素方差分析(表 1),结果显示,各时间点 B、C 组和 D 组均小于 A 组并有非常显著性差异($P<0.01$),B、C 组与 D 组比较无显著性差异($P>0.05$),从 CRNV 面积与角膜面积比的均值上看,B 组与 C 组组间比较无显著性差异($P>0.05$),均值比较 C 组具有优于 B 组的趋势。

表 1 CRNV 面积与角膜面积比值的比较($x \pm s$)

分组	眼数(只)	1 d	3 d	7 d	14 d
A	8	0	0.28 ± 0.08	0.47 ± 0.09	0.55 ± 0.05
B	8	0	0.19 ± 0.06[b]	0.31 ± 0.08[a]	0.44 ± 0.05[a]
C	7	0	0.16 ± 0.04[a]	0.28 ± 0.06[a]	0.35 ± 0.05[a]
D	6	0	0.18 ± 0.06[a]	0.24 ± 0.05[a]	0.28 ± 0.10[a]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与 A 组比较

3 讨论

抗血管新生一直是国内外学者十分关注的领域[3],抗 CRNV 临床上多用糖皮质激素类抗炎药物或免疫抑制剂,这些药物对抑制新生血管有一定的作用,但存在较强的组织、细胞毒性。限制了其在临床的广泛应用,因此迫切需要研究和开发理想的高效低毒药物。

CRNV 形成的机制尚不十分明了,在肿瘤血管发生研究领域证实的血管发生因子(如成纤维生长因子、血管内皮细胞生长因子)和抗血管发生因子(如血管他丁、内皮他丁、色素上皮源性因子)之间的平衡在角膜中也存在。角膜的炎症、感染、变性、外伤都会使这一平衡倾斜,刺激原有的角膜缘血管产生新的血管,同时金属蛋白酶和其他蛋白水解酶活性增加,降解细胞基底膜和细胞外基质,导致 CRNV 向角膜生长[3,4]。

诺帝(Nordy)是我们前期研制的 NDGA 手性化合物。NDGA 是从常青灌木 *Larrea divaricata* 和 *Guaiacum officinale* 中提取的一种天然成分。它是花生四稀酸代谢途径中作用最强的特异性脂氧化酶抑制剂,早期主要用于抗炎和拮抗自由基等氧化应激反应[5]。既往研究已证实 NDGA 抗胶质瘤细胞分化的同时,具有显著抑制血管内皮细胞增殖、迁移,抑制血管生长因子及其受体的作用[1,3]。但天然 NDGA 纯化困难,成本高,限制了该类物质的应用。前期研究证实,将诺帝腹腔注射用于大鼠糖尿病性视网膜病变模型,有明显抗血管生成和抑制视网膜增生性胶质细胞反应作用[2],提示诺帝有可能应用于眼内新生血管的治疗。

滴眼液治疗是眼科最常见的给药方式,具有简单、方便、无痛苦等优点。我们将诺帝配制成滴眼液剂型,并经过高压液相色谱分析检测,滴眼液中诺帝结构稳定,滴眼液的理化指标均符合眼科使用要求。滴眼液的无毒性是其眼部应用的前提,因此我们以不同剂量诺帝滴眼液及其空白溶液滴眼 21 d 进行观察,结果显示用诺帝滴眼液后,未见明显眼红、畏光等刺激症状,裂隙灯观察、病理切片、透射电镜观察未见结构改变及异常细胞浸润。说明诺帝滴眼液用于眼部治疗是安全的,为下一步药效检测及今后临床使用奠定了基础。

在诺帝滴眼液药效学检测中我们发现诺帝滴眼液对 CRNV 有明显的抑制作用。与阴性对照组相比,0.025% 及 0.1% 诺帝滴眼液治疗组的 CRNV 生长缓慢,退化发生早,一般在 14 d 时周边小血管已有退化现象。从 CRNV 与自身角膜面积比值来看,不同浓度治疗组与阴性对照组比较均有显著性差异($P<0.01$),说明两种浓度对抑制 CRNV 均有作用。0.025% 和 0.1% 两个不同治疗组组间比较对 CRNV 的抑制无显著性差异($P>0.05$),但从均值看 0.1% 治疗组有优于 0.025% 治疗组的趋势。

糖皮质激素眼液是目前临床上主要的治疗 CRNV 的药物,通过抑制炎症细胞的聚集、阻止炎前因子的合成、抑制血管内皮细胞的增生、移行发挥作用[6],所以我们选用地塞米松滴眼液作为阳性对照。与地塞米松组相比,治疗组 CRNV,血管生长、退化无明显差异。从 CRNV 与自身角膜面积比值来看,治疗组与地塞米松组比较无显著性差异($P>0.05$),但长期使用糖皮质激素滴眼,其并发症是严重的,它明显延缓角膜上皮的修复,导致溃疡形成,且角膜穿孔率明显[7-9]。这一点在我们的实验过程中也得到证实,地塞米松组角膜上皮缺损修复不佳,且有 2 眼穿孔。而治疗组未发生

穿孔现象，说明诺帝滴眼液比地塞米松治疗安全。我们也曾考虑通过结膜下注射的给药方式来局部给予地塞米松，这样会减少其并发症的发生，但不同给药方式会造成给药剂量、眼部刺激的不同，降低了与治疗组的可对比性。且本实验主要是观察CRNV的抑制情况，故采用一致的滴眼给药方式。

综上所述，诺帝滴眼液具有抑制CRNV作用，其中0.1%浓度作用效果可能最佳。本实验为一种新的安全、有效的抗CRNV药物的探索和开发提供了实验依据，诺帝滴眼液药代动力学及其抑制CRNV的机制有待深入研究，以期为该药应用于临床打下坚实的实验基础。

参考文献：

[1] BIAN X W, JIANG X F, CHEN J H, *et al*. Increased angiogenic capabilities of endothelial cells from microvessels of malignant human gliomas[J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6(1): 90-99.
[2] 戴 超，卞修武，史景泉. 诺帝抑制糖尿病大鼠视网膜增生性胶质反应[J]. 眼科新进展, 2005, 25(2): 116-119.
[3] CHANG J H, GABISON E E, KATO T, *et al*. Corneal neovascularization [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2001, (12): 242-249.
[4] BIAN X W, CHEN J H, JIANG X F, *et al*. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(12): 1537-1547.
[5] LAMBERT J D, DORR R T, TIMMERMANN B N. Nordihydroguaiaretic acid: A Review of Its Numerous and Varied Biological Activities [J]. Pharm Biol, 2004, 42(2): 149-158.
[6] 惠延年. 眼科学[M]. 第6版. 北京：人民卫生出版社, 2004: 108-109.
[7] MORAD Y, BANIN E, AVERBUKH E, *et al*. Treatment of ocular tissues exposed to nitrogen mustard: beneficial effect of zinc desferrioxamine combined with steroids [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(5): 1640-1646.
[8] CHUNG J H, KANG Y G, KIM H J. Effect of 0.1% dexamethasone on epithelial healing in experimental corneal alkali wounds: morphological changes during the repair process[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998, 236(7): 537-545.
[9] 戴 超，卞修武，史景泉. 诺帝抑制糖尿病大鼠视网膜VEGF和iNOS的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1232-1235.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2006)06-0583-01

个案与短篇

Studer回肠代膀胱术23例

胡兴平，王 豪，张 力，徐 军 （成都市第五人民医院泌尿外科，成都 611130）

1993年10月至2005年6月，我院采用Studer手术治疗23例膀胱癌患者，效果满意，现报告如下

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组23例，男性19例，女性4例，年龄35~71岁，全部术前确诊为膀胱移行细胞癌，其中多发肿瘤8例，电切术后或膀胱部分切除术后复发15例。病理分类：Ⅰ级1例，Ⅰ~Ⅱ级13例，Ⅱ~Ⅲ级9例，临床分期：T$_1$ 15例，T$_2$ 8例，其中1例合并糖尿病

1.2 手术方法

常规方法施行膀胱全切术，男性包括精囊，输精管部分及前列腺大部分，残端冰冻切片。参照Studer方法，取末段回肠50 cm，远端40 cm作"U"型折叠，纵行切开肠对系膜缘，用3-0可吸收缝线一层连续缝合，制成球形贮尿囊。用双"J"管支撑输尿管，下端逢于保留尿管尖端。贮尿囊最低位与残端尿道吻合6针。术后3 d用生理盐水冲洗回肠膀胱，术后10~12 d拔除回肠膀胱造瘘管、术后15 d拔除尿管及双"J"管，训练患者增加腹压排尿，术后1、3、6个月复查肾功、电解质、CO$_2$CP及B超。

2 结果

手术时间6~8.5 h，平均7.2 h，术中输血400~1 200 ml，平均700 ml，2例出现术全性肠梗阻，保守治疗好转。1例在拔除尿管后出现有腰疼痛及发热，重新安置尿管引流及抗感染治疗，1周后拔除尿管，腰痛及发热消失。全部患者拔除尿管后白天均能控制排尿，8例有少量夜间尿失禁，术后3个月随访仅剩2例。2例在最初随访的1个月中，发现有高氯性酸中毒，经治疗后换复正常。术后2例死亡，其中1例术后2年死于肿瘤转移，另1例3.5年死于糖尿病并发症

3 讨论

膀胱全切后理想的代膀胱应具备低压、可控、大容量、抗逆流、高顺应性及良好的排空能力。Studer等[1]结合了Camey等[2]保留尿道外括约肌和Kock等[3]怀状拼盘技术的优点，完成的可控回肠代膀胱术基本满足上述的要求，效果满意。在临床上得到广泛应用

由于采用回肠代膀胱，贮存于回肠膀胱中尿流的代谢产物被重吸收入血，高比重的尿液通过渗透作用将肠壁水分向腔内转移。因此患者在术后早期可能出现水、电解质、酸碱平衡的变化，表现出口渴，多饮，尿量增加等。Mills等[4]认为出现这些代谢紊乱，可能与选择肠管类型和使用肠管长度有关。本

（下转586页）

作者简介：胡兴平（1958~），男，重庆市人，副主任医师，主要从事泌尿外科方面的研究。电话：028-82726298

收稿日期：2005-12-10；修回日期：2006-02-08