基础研究 文章编号:0253-3626(2009)09-1239-03

bFGF 胶联羊膜缓释药膜治疗角膜碱烧伤的实验研究

蔡明铭,赵 敏
(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察一种羊膜药物缓释材料 -bFGF 胶联羊膜缓释药膜治疗兔角膜碱烧伤的效果,为其临床应用提供实验依据。方法:将含有 bFGF 的纤维蛋白胶与羊膜胶联,制成 bFGF 胶联羊膜缓释药膜。建立新西兰大白兔角膜碱烧伤模型,45 只新西兰大白兔随机分为 bFGF 胶联药膜移植组(bFAM)、单层羊膜移植组(AM)、对照组(CG),每组 15 只。术后观察临床治疗效果;并分别于术后第 7、14、28 d 各组处死 5 只动物,取标本作组织病理学检查,用免疫组织化学方法半定量检测角膜中 bFGF 的表达。结果:术后 bFAM 组在炎症反应、组织修复及抑制新生血管方面都显著优于 AM 组。术后 7 d bFAM 组 bFGF 表达显著高于 AM 组及对照组,其余各时间点差异无统计学意义。结论:bFGF 胶联羊膜缓释药膜移植治疗兔角膜碱烧伤较单层羊膜具有更好的治疗效果。

【关键词】缓释;纤维蛋白胶;羊膜;碱性成纤维细胞生长因子(bFGF);碱烧伤
【中国图书分类法分类号】R816.97 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-23

The experimental study of bFGF-fibrin gule-amniotic membrane on corneal alkali burns

CAI Ming-ming, et al
(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of a new medical biomaterial—bfgf-fibrin glue-amniotic membrane (bFAM) for corneal alkali burn and provide experimental foundation for the clinical application in the future. *Methods*: We use fibrin glue compounded with bFGF and amniotic membrane to prepare the bFAM. 45 New Zealand rabbits were used to make corneal alkali burn models and divided into 3 groups: bFAM group、amniotic membrane group、comparison group, each group have 15 rabbits. After operation, we observe the linical curative effect. 7d、14d and 28d after operation, 5 corneas were extracted for histopathological analysis. The expression of bFGF in corneas was measured by immunohistochemistry analysis. *Results*: After operation, bFAM group have better curative effect than amniotic membrane group in Inflammatory reaction、tissue repair and anti-CNV. The expression of bFGF in bFAM group is much higher than amniotic membrane group and comparison group in the day 7 afer operation, and in other time points the expression have not distinct difference in all groups. *Conclusion*: Compared with single layer amniotic membrane, bFAM shows better curative effect for corneal alkali burn.

【Key words】Sustained release; Fibrin glue; Amniotic membrane; Fibroblast growth factor, basic(bFGF); Alkali burn

碱性成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, basic; bFGF)作为一种具有广谱作用的细胞因子,已广泛受到人们的关注。研究表明其有促进角膜上皮细胞、角膜基质细胞损伤修复等作用[1]。纤维蛋白胶(Fibrin glue, FG)是应用于外科手术中发挥止血、封闭、粘合及缓释作用的生物制剂。近年来,FG 逐渐应用于临床各科,尤其作为某些药物的缓释载体,其作用日益受到人们的重视[2]。羊膜具有抑止炎症、促进眼表上皮化、抑止角膜基质溶解和减轻瘢痕形成的独特作用[3],是一种优良的生物学材料。目前,我们在现有技术的基础上,将含有 bFGF 的纤维蛋白胶与羊膜胶联,制备一种 bFGF 胶联羊膜缓释药膜,用于组织重建及创伤愈合。本实验研究 bFGF 胶联羊膜缓释药膜对碱烧伤角膜的作用,并探讨其用于眼表重建的可行性。

作者介绍:蔡明铭(1982-),女,硕士,
研究方向:角膜与眼表疾病。
通讯作者:赵 敏,男,教授,E-mail: minzhao2002@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市科委科学基金资助课题(渝科委计 2003-23)。

1 材料和方法

1.1 实验材料

bFGF 冻干粉剂(珠海亿胜生物制药有限公司),FG(广州倍绣生物技术有限公司),Rabbit Anti-bFGF (武汉博士德公司),新西兰大白兔(重庆医科大学实验动物中心)。

1.2 bFGF 胶联药膜的制备

将 300 μg/ml 的 bFGF 溶液 50 μl 溶于 1.5 ml FG 催化液中，并与 1.5 ml FG 主体液分别注入混合注射器中，将 bFGF-FG 均匀喷涂于羊膜上，轻压 2~3 min，确保 bFGF-FG 与羊膜粘合紧密。

1.3 动物实验

1.3.1 动物分组及造模 新西兰大白兔 45 只，右眼为实验眼。随机分为 bFGF 胶联药膜组（bFAM）、单层羊膜组（AM）以及对照组（CG），每组 15 只。速眠新Ⅱ肌肉注射麻醉。将直径 8 mm 的圆形滤纸片浸泡于 1 mol/L 的 NaOH 中，浸透后将其贴于角膜中央，轻压 30 s 后取下，迅速用 30 ml 生理盐水反复冲洗。4~6 h 内行羊膜覆盖术。

1.3.2 手术方法及取材 将 bFGF 胶联药膜平整覆盖于角膜表面，使纤维蛋白胶面与角膜紧密贴合，8/0 尼龙线 16 针缝合固定于角膜缘后浅层巩膜。单层羊膜覆盖手术方法同 bFGF 胶联药膜。术后 7、14、28 d，每个时间点按实验动物分组随机处死 5 只动物，取角膜固定于 4%多聚甲醛溶液中待检。

1.3.3 大体观察 术后每日用手持式裂隙灯观察角结膜充血水肿、分泌物、植片脱落溶解等情况，第 14、28 d 对角膜浑浊、新生血管及荧光素钠染色情况进行评分。其评分分别参照 Yamada[4]、Philipp[5]、周道伐[6]等人提出的标准。

1.3.4 组织病理观察 常规脱水，包埋，HE 染色，光镜观察。

1.3.5 免疫组织化学分析 兔抗 bFGF 作为一抗，按 Sp 免疫组化试剂盒说明进行染色，DAB 显色。光镜下观察，照相并测定阳性平均积分光密度（AOD），半定量分析实验组和对照组 bFGF 表达差异。

1.4 统计学处理

实验资料采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，差异显著性采用方差分析检验。所有数据均应用 SPSS11.5 处理，$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大体观察（表 1~3）

2.1.1 羊膜溶解脱落情况 术后第 5 d 时，单层羊膜溶解，部分动物角膜表面单层羊膜完全脱落，而 bFGF 胶联药膜尚无明显变化。至术后 14 d 时，bFGF 胶联药膜大部分溶解脱落。

2.1.2 角膜混浊度评分 角膜碱烧伤后立即呈灰白色致密混浊。术后第 2~5 d，各组动物角膜水肿程度较重，之后逐渐减轻，角膜透明度有所提高。术后 28d 时，bFAM 组与 AM 组以及 AM 组与对照组间比较差异均有统计学意义（$P<0.05$），bFAM 组角膜混浊度最轻。

2.1.3 角膜新生血管评分情况 术后 7 d 各组均可见新生血管芽从角膜缘生长。第 14 d 时，两实验组角膜新生血管评分与对照组差异无统计学意义（$P>0.05$）；28 d 时，bFAM 组角膜新生血管面积明显小于对照组（$P<0.01$），AM 组亦小于对照组（$P<0.05$）。

2.1.4 角膜上皮愈合情况 术后第 14、28 d 时，bFAM 组及 AM 组角膜上皮愈合面积均明显多于损伤对照组（$P<0.01$），且 2 个时间点 2 实验组角膜上皮愈合面积差异具统计学意义（$P<0.05$）。

2.2 组织病理学观察（图 1~2）

术后 7 d，3 个组损伤区角膜上皮细胞都有不同程度的坏死脱落，角膜基质增厚水肿明显，炎症细胞浸润；bFAM 组，炎症细胞多集中于纤维蛋白胶下，角膜基质较少受累。术后 14 d，对照组角膜大量炎症细胞浸润，基质胶原纤维疏松，角膜上皮排列紊乱；bFAM 组，部分切片仍可见尚未完全降解的羊膜，新生角膜上皮形状整齐规则，角膜基质肿胀不明显，胶原纤维排列较整齐。术后 28 d，对照组角膜基质中仍有炎症细胞浸润，大量新生血管长入，新生上皮细胞排列紊乱，与角膜基质连接疏松，部分区域上皮细胞脱落；bFAM 组，5~7 层复层上皮细胞与角膜基质紧密连接，胶原纤维排列整齐。AM 组情况介于 bFAM 组与对照组之间。

角膜上皮细胞完整，与角膜基质连接紧密。角膜上皮细胞坏死脱落，基质中大量 PMNS 浸润。

表 1 各组角膜混浊度评分（分，$\bar{x} \pm s$）

组别	术后时间(d)	
	14	28
bFAM	3.600 0 ± 0.547 7	2.400 0 ± 0.547 7#
AM	4.000 0 ± 0.707 1	3.200 0 ± 0.447 2*
CG	4.400 0 ± 0.547 7	4.200 0 ± 0.447 2

注：# 表示与对照组比较 $P<0.01$；* 表示与对照组比较 $P<0.05$

表 2 各组角膜新生血管评分（分，$\bar{x} \pm s$）

组别	术后时间(d)	
	14	28
bFAM	2.000 0 ± 1.000 0	2.000 0 ± 0.707 1#
AM	2.600 0 ± 0.547 7	2.800 0 ± 0.447 2*
CG	3.000 0 ± 0.707 1	3.800 0 ± 0.447 2

注：# 表示与对照组比较 $P<0.01$；* 表示与对照组比较 $P<0.05$

表 3 各组角膜荧光素染色情况（分，$\bar{x} \pm s$）

组别	术后时间(d)	
	14	28
bFAM	0.400 0 ± 0.547 7#	0.200 0 ± 0.447 2#
AM	1.400 0 ± 0.894 4*	1.200 0 ± 0.836 7*
CG	2.600 0 ± 0.547 7	2.400 0 ± 0.547 7

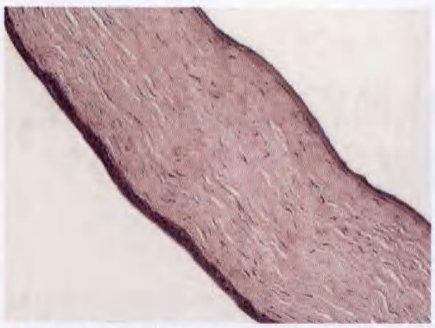
注：# 表示与对照组比较 $P<0.01$；* 表示与对照组比较 $P<0.05$

2.3 免疫组化染色检测（表 4，图 3、4）

bFGF 阳性细胞胞浆或胞膜呈棕黄色，角膜上皮细胞，基质细胞及新生血管内皮细胞中均有表达。正常角膜中 bFGF 表达极少，但角膜碱烧伤后 3 个组均检测出 bFGF 呈高水平表达。术后 7 d 时，bFAM 组显著高于 AM 组及对照组（$P<0.05$），其阳性表达主要位于角膜上皮细胞及浅基质层。其余时间点 3 组间 bFGF 表达无显著差异（$P>0.05$）。

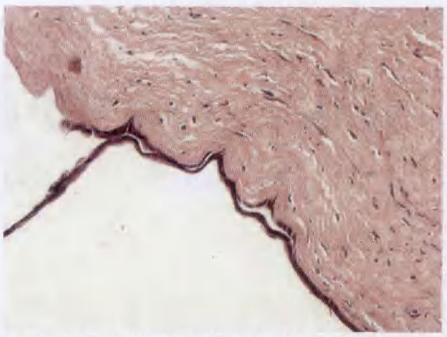
3 讨 论

本实验将羊膜作为承载体，纤维蛋白胶作为 bFGF 的缓释载体，用于治疗兔角膜碱烧伤并取得显著疗效，我们推测这可能与以下作用有关：（1）bFGF 胶联羊膜缓释药膜不仅具有普通羊膜的多种生物学活性，还具有纤维蛋白胶的协同治疗作用。两者粘合而成的胶联羊膜具有较强的亲水性、高



角膜上皮细胞完整，与角膜基质连接紧密

图 1 烧伤后 28 d，bFAM 组 HE 染色(×200)



角膜上皮细胞坏死脱落，基质中大量 PMNS 浸润

图 2 烧伤后 7 d，对照组角膜 HE 染色(×200)

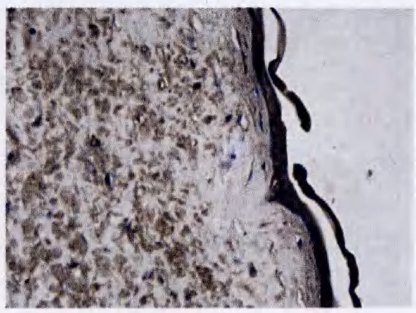


图 3 碱烧伤后 7 d，bFAM 组角膜 SABC 法FGF-2 染色(×400)

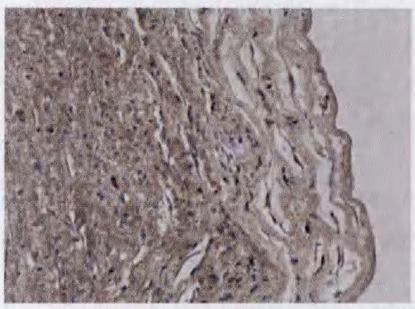


图 4 碱烧伤后 7 d，对照组角膜 SABC 法 FGF-2 染色(×400)

表 4 各组角膜中 bFGF 的表达(AOD，$\bar{x}\pm s$)

组别	术后时间(d)		
	7	14	28
bFAM	0.099 0 ± 0.010 3#	0.031 1 ± 0.005 3	0.016 6 ± 0.005 0
AM	0.039 2 ± 0.005 7	0.025 6 ± 0.004 7	0.013 2 ± 0.004 8
CG	0.033 0 ± 0.004 8	0.025 3 ± 0.008 6	0.012 6 ± 0.005 2

度的透氧性及细胞支架作用，较普通羊膜更有利于碱烧伤后角膜上皮细胞的再生。同时，纤维蛋白胶与羊膜复合的胶联羊膜作为 bFGF 的载体发挥了重要的缓释作用。(2)bFGF 易被酶水解，在体内的半衰期仅有 3~10 min 左右，生物利用度低。而含 bFGF的胶联药膜可在眼表持续释放 bFGF，并维持在有效生理浓度以上。本实验观察到，术后 7 d 时，bFAM 组 bFGF 表达水平显著高于 AM 组及对照组，阳性表达主要位于角膜浅基质层。这表明外源性 bFGF 不仅有促进角膜损伤愈合的作用，还可以促进内源性 bFGF 和其它生长因子的释放从而协同促进创伤组织再生及功能恢复，防止角膜基质溶解穿孔。(3) 实验结果表明，碱烧伤早期应用含一定浓度 bFGF 胶联羊膜缓释药膜具有抑制新生血管的作用。可能的原因为：纤维蛋白胶和羊膜均有显著抑制新生血管的作用；碱烧伤后的炎性产物和缺氧可促新生血管形成，而bFGF 可使角膜损伤修复，炎性反应减轻，从而使 CNV 减轻[7]；泪液的影响、药物的不稳定性及穿透性以及 bFGF 可迅速修复上皮面屏障等因素；bFGF 有利于角膜上皮细胞、基质细胞、内皮细胞增生，这些细胞都有 CNV 抑制作用。(4) bFGF 胶联羊膜缓释药膜作为一种优良的移植材料，可将其牢固缝合于眼表，使其紧密贴附于创面，从而有效地发挥治疗作用。

利用含有 bFGF 的纤维蛋白胶与羊膜胶联制成的 bFGF 胶联羊膜缓释药膜治疗眼表碱烧伤，国内外尚未见相关报道。本实验结果证实，bFGF 胶联羊膜缓释药膜可以明显促进眼表上皮的再生及稳定、抑制新生血管形成、减轻角膜瘢痕、防止角膜基质溶解穿孔，是治疗眼表化学性碱烧伤的新手段，具有广泛的临床应用前景。

参 考 文 献

[1] 聂庆珠，尹树国.碱性成纤维细胞生长因子治疗兔角膜上皮及基质损伤的实验研究[J].中国实用眼科杂志，2000，18(6)：340-343.

[2] 郭 莉.纤维蛋白胶的研究进展[J].实用肿瘤学杂志，2006，20(5)：458-460.

[3] Meller D，Pires R T，Mack R J，et al.Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns[J]. Ophthalmology，2000，107(5)：980-990.

[4] Yamada J，Dana M R，Sotozono C，et al.Local suppression of IL-1by receptor antagonist in the rat model of corneal alkali injury[J]. Exp Eye Res，2003，76(2)：161-167.

[5] Philipp W，Speicher L.Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas[J].Invest Ophthalmol Vos Sci，2000，41(9)：2514-2522.

[6] 周道伐.眼科急诊[M].北京：人民卫生出版社，1991.164.

[7] Conners M S，Urbano F，Vafeas C，et al.Alkali burn induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis sci，1997，38(10)：1963-1971.

（责任编辑：冉明会）