

## 强力霉素抑制鼠眼化学伤角膜新生血管形成

梁丹, 颜世龙, 林妙丽, 李永平, 汪振芳  
(中山大学中山眼科中心眼外伤科, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】观察强力霉素对鼠眼化学伤角膜新生血管形成的影响。【方法】取SD大鼠42只,制成眼碱性化学伤模型,随机分为强力霉素治疗组与对照组,每组21只大鼠(右眼),治疗组强力霉素30mg/(kg·d)灌胃给药,对照组等量生理盐水灌胃。裂隙灯观察角膜新生血管、角膜水肿、上皮缺损愈合及眼前段情况,分别于3、7、14、21、28、35d裂隙灯照相并计算新生血管面积及新生血管抑制率。【结果】两组大鼠伤后第1天角膜缘血管网扩张充血,3d时血管开始侵入角膜,7~14d时新生血管达到高峰,14~21d后新生血管逐渐回退;两组角膜新生血管长度、新生血管面积及角膜水肿程度存在差异( $P < 0.05$ );各时间点角膜新生血管抑制率为35.8%~53.3%,随时间推移呈上升趋势。【结论】强力霉素能有效地抑制眼化学伤诱导的角膜新生血管形成。

**关键词:**强力霉素;化学伤;角膜新生血管

**中图分类号:**R77

**文献标识码:**A

**文章编号:**1672-3554(2005)02-0183-05

### An Experimental Study of Anti-angiogenesis Effects of Doxycycline on Corneal Neovascularization in Rats Induced by Alkali Injury

LIANG Dan, YAN Shi-long, LIN Miao-li, LI Yong-ping, WANG Zhen-fang  
(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:**【Objective】The purpose of this series of experiments was to test whether systemic applied doxycycline could suppress corneal neovascularization (CNV) after alkali injury.【Methods】Alkali injury was induced on day 0 by application of 1 mol/L NaOH to right eyes of S-D rats ( $n=42$ ) for 40 s. All animals were randomly assigned to treated group and control group, each consisting of twenty-one eyes. Treated group received systemic doxycycline once daily in 30 mg/kg dosage during days 1-35. Control group received systemic vehicle once daily also. Biomicroscopic features including corneal edema, epithelial defect, characteristics of anterior segment, and neovascularization were measured on 3 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d, and 35 d. The area and inhibitory rate of CNV was calculated.【Results】The vessel meshworks of corneal limb were dilated and congested on the first day, then CNV began to invade cornea on day 3, and reached to its developmental peaks between 7d and 14d, lastly, CNV started to regress in 14-21 days after alkali injury. Significant difference ( $P < 0.05$ ) in the area of CNV, average length of CNV and corneal edema was found respectively between control group and treated group ( $P < 0.05$ ). The inhibitory rate of CNV ranges from 35.8% to 53.3% and increases with time prolonging.【Conclusions】Doxycycline has prominent inhibitory effectiveness on corneal angiogenesis induced by alkali injury.

**Key words:** doxycycline; alkali injury; corneal neovascularization

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci),2005,26(2):183-187]

角膜新生血管(neovascularization, NV)是多种眼表疾病如眼化学伤、热烧伤、感染性角膜病、非感染性角膜病、角膜变性、严重干眼症的共同病理特征。大量的角膜NV不仅严重影响视力,也是角膜

移植术后排斥反应的高危因素,手术失败率超过90%以上<sup>[1]</sup>,目前无理想治疗方法。近年研究显示,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在NV形成中发挥着重要作用<sup>[2-4]</sup>。既往研究显示,

收稿日期:2004-12-09

基金项目:广东省科技计划基金资助项目(2004B30901011)

作者简介:梁丹(1963-),女,湖南长沙人,博士,副教授,眼外伤科副主任。E-mail:liangd@gf.com.cn

独立于抗菌活性之外,四环素类抗生素具有抑制 MMPs 降解细胞外基质的功效。强力霉素(doxycycline)是半合成的四环素类抗生素,是目前临床可应用的活性最强的 MMPs 抑制剂<sup>[5]</sup>。File 等<sup>[6]</sup>报告强力霉素在体外抑制培养人脐静脉血管内皮细胞在血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导下的微血管形成,为此我们通过鼠眼化学伤模型观察强力霉素对化学伤诱导角膜 NV 形成的影响,相关研究国内、外未见报告。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验对象与眼碱性化学伤动物模型的制作

健康清洁级雌性 SD 大鼠 42 只,体质量 180~200 g,所有动物由广东省医学检验动物中心提供。取 Whatman 3# 滤纸,用角膜环钻取直径 3 mm 滤纸片。将大鼠用氯胺酮及氯丙嗪诱导全身麻醉(1:1 等量混合 0.3 mL),将浸润 20 s 的 1 mol/L 氢氧化钠滤纸片置于鼠右眼角膜中央 40 s,然后立即用 60 mL 生理盐水冲洗烧灼区及结膜囊 1 min。

### 1.2 分组与处理

随机将鼠分成强力霉素治疗组及对照组,每组 21 只。伤后 1 d 实验鼠右眼开始滴妥布霉素眼药水每天 4 次,每次 1 滴,晚上涂妥布霉素眼膏。将常州制药厂制造的 100 mg/片的强力霉素片剂研磨成粉剂溶于 10 mL 注射用灭菌用水中,配置为 10 mg/mL 的强力霉素水溶液,治疗组按每天 30 mg/kg 的剂量灌胃给药,每天 1 次性灌胃强力霉素水溶液 0.54~0.6 mL,首剂加倍。连续治疗 35 d。对照组每天分别灌胃等量的生理盐水。所有实验鼠观察 35 d,每天裂隙灯观察角膜、前房、晶体等眼前段情况。

### 1.3 角膜新生血管的动态定量观察

为避免人为因素影响,动物模型制作、分组及治疗由第一与第二作者实施,角膜 NV 长度、钟点数、角膜上皮缺损区面积、角膜水肿程度由第 3 作者观察,且观察者预先不知实验鼠组别。

伤后 24 h 裂隙灯显微镜观察角膜 NV 生长情况,并在 3、7、14、21、28、35 d 检测自角巩膜缘长出的 NV 长度和钟点数,并裂隙灯显微镜下摄影。NV 长度计算:以大鼠角膜 9 点到 3 点划一横线将角膜分成上下两部分,再由 12 点到 6 点划一条线,这

两条线将角膜分成 4 个象限:鼻上、鼻下、颞上、颞下,分别测量各象限内最长的一支血管长度。角膜新生血管面积计算: $A=C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r-l)^2]$ <sup>[7]</sup>,其中  $C$  为 NV 累及角膜的圆周钟点数, $l$  即所取的血管长度,大鼠角膜半径  $r=3$  mm。NV 总面积等于 4 个象限面积之和。角膜 NV 抑制率为对照组与治疗组 NV 平均面积之差除以对照组 NV 平均面积。

### 1.4 角膜上皮缺损

荧光素染色观察角膜上皮缺损区与持续时间。上皮缺损区的最大直径及其平分垂直径的乘积为角膜上皮缺损面积。

### 1.5 角膜水肿评估

角膜水肿采用 Dickey<sup>[8]</sup>分级标准:0 级,角膜透明;I 级,角膜轻度雾状混浊;II 级,角膜混浊,但前房结构清晰可见;III 级,混浊加重,前房观察困难;IV 级,角膜严重混浊,前房不能窥见。分别于 3、7、14、21、28、35 d 记录角膜水肿情况。

### 1.6 统计学方法

数据统计运算采用 SAS9.0 统计软件包进行处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,差异显著性采用重复测量数据分析检验及  $t$  检验。计数资料采用 CATMOD 模块对具有重复测量的分等级反应变量进行分析。部分资料采用  $\chi^2$  检验。取  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 角膜新生血管长度、面积及新生血管抑制率

强力霉素治疗组:烧灼区轻度混浊,炎症反应轻,角膜 NV 细小,短而稀疏,多集中于上下方角膜缘,且生长缓慢,烧伤后 24 h 内可见角膜缘血管网扩张充血,第 3 天时 NV 开始侵入角膜,第 7~14 天达到生长旺盛期,NV 基本止于角膜烧灼区边缘,第 21 天开始 NV 开始回退(图 1A、C、E)。各时间点角膜 NV 的平均长度为  $(0.34 \pm 0.04)$  mm 至  $(1.52 \pm 0.14)$  mm,角膜 NV 面积为  $(6 \pm 3)$  mm<sup>2</sup> 至  $(11 \pm 12)$  mm<sup>2</sup>。

对照组:烧灼区混浊明显,炎症反应重,角膜 NV 粗大而长,较稠密,生长较快,几乎覆盖整个角膜,所有 NV 均长入烧灼区,其生长消退周期基本与强力霉素治疗组一致,但 NV 持续时间延长,NV 回退时间延迟(图 1B、D、F)。各时间点角膜 NV 的平均长度为  $(0.55 \pm 0.05)$  mm 至  $(2.23 \pm 0.25)$  mm,角膜 NV 面积为  $(9 \pm 2)$  mm<sup>2</sup> 至  $(22 \pm 10)$  mm<sup>2</sup>。

各时间点两组角膜 NV 长度见表 1,重复测量数据分析检验显示两组 NV 平均长度具有总体差异 ( $F=21.63, P < 0.0001$ );  $t$  检验显示 3、7、14、21 d 两组角膜 NV 平均长度的差异具有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 28、35 d 两组 NV 长度存在差异, 但不具有统计学意义。NV 面积及抑制率见表 2, 重复测量

数据分析检验显示两组 NV 面积有总体差异及组内 NV 面积的时间效应差异均有统计学意义 ( $F=11.16, P < 0.01$ ); 检验同时表明各时间点两组角膜 NV 面积差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。各时间点角膜 NV 的抑制率为 35.8 %~53.3 %, 随时间推移呈上升趋势。

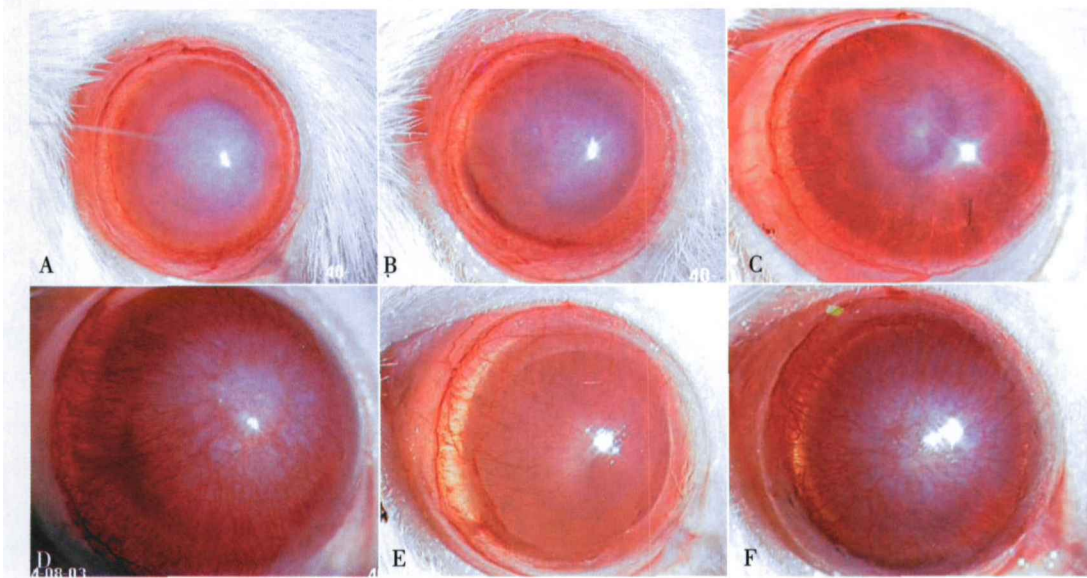


图 1 治疗组与对照组裂隙灯照片

Fig.1 Biomicroscopic photo of treated group and control group

A: The figure of treated group on day 3 after alkali injury: small NV around peri-cornea begin to invade cornea toward the central cornea of burn. B: Control group on day 3: small NV around peri-cornea begin to invade cornea toward the central cornea of burn also. C: Treated group on day 14: CNV distribute scatteredly and the growth tends to the state of stabilization. D: Control group on day 14: CNV distribute densely and mantle almost all over the cornea like a web. E: Treated group on day 28: scattered CNV are fine and localized only in super-temporal quadrant of the eye. F: Control group on day 28: dense CNV distribute still all over the cornea and have no obvious regression in comparison with that of figure D

表 1 角膜新生血管平均长度

Table 1 The average length of corneal neovascularization ( $\bar{x} \pm s$ , mm)

Group	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
Treated	0.35±0.18	1.37±0.47	1.91±1.05	1.89±1.29	1.69±1.38	1.93±1.14
Control	0.55±0.23	1.72±0.60	2.64±0.72	2.59±0.91	2.33±1.17	2.21±1.21
$t$	3.061 3	2.099 0	2.610 6	2.022 5	1.628 1	0.779 0
$P$	0.003 9	0.042 2	0.012 7	0.049 8	0.111 4	0.440 5

表 2 角膜新生血管面积和抑制率

Table 2 The area of corneal neovascularization and inhibitory rate ( $\bar{x} \pm s$ , mm<sup>2</sup>)

Group	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
Treated	6±3	12±9	11±11	11±12	10±12	11±12
Control	9±2	21±7	22±10	20±11	20±12	20±10
$t$	3.76	3.48	2.82	2.50	2.16	2.49
$P$	0.000 5	0.001 2	0.007 5	0.016 7	0.037 0	0.016 9
Inhibitory rate	35.8 %	44.8 %	49.7 %	49.1 %	49.7 %	53.3 %

2.2 角膜上皮缺损

两组角膜上皮缺损的程度与范围基本一致,

伤后第 1 天, 鼠眼出现程度不同的角膜上皮缺损区, 面积为(2.69±0.38) mm<sup>2</sup>, 伤后第 2 天, 两组的

角膜上皮缺损基本愈合,表现为弥漫散在的点状上皮着色,无片状上皮缺损。点状着色于伤后 10 d 左右消失。

### 2.3 角膜水肿程度及其比较

**强力霉素治疗组:**烧伤早期角膜水肿明显,角膜 NV 生长稳定后,角膜水肿逐渐消退,伴随着 NV 的回退,角膜水肿消失。

**对照组:**早期角膜水肿明显,角膜 NV 生长稳定后始终伴随着一定程度的角膜水肿,后期虽然减轻但角膜水肿消退明显延迟。

各时间点两组角膜水肿程度构成比见图 2, CATMOD 模块分析两组间差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 同时组内角膜水肿的时间效应亦具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

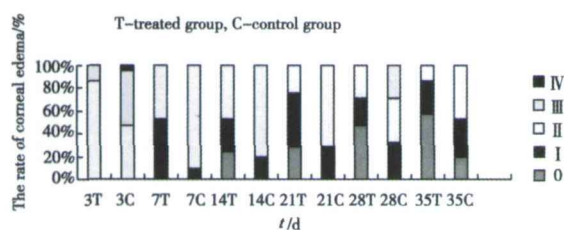


图 2 治疗组与对照组角膜水肿比率图

Fig.2 The figure of rate of corneal edema between treated group and control group

### 2.4 眼部其他改变

伤后 48 h 部分实验鼠开始出现前房积血, 3、7、14、21、28、35 d 治疗组前房积血的发生率分别为 33.3% (7/21)、28.6% (6/21)、28.6% (6/21)、28.6% (6/21)、28.6% (6/21)、23.8% (5/21); 对照组的发生率为 43.6% (9/21)、57.1% (12/21)、57.1% (12/21)、47.6% (10/21)、52.4% (11/21)、52.4% (11/21)。 $\chi^2$  检验各对应时间点两组前房积血发生率差异没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

治疗组最早于伤后 21 d 出现白内障, 35 d 时白内障发生率为 4.8% (1/21); 对照组则于伤后 16 d 就出现白内障, 35 d 时白内障发生率为 14.3% (3/21),  $\chi^2$  检验表明两组白内障发生率的差异没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

抑制角膜新生血管形成是改善眼化学伤等眼表疾病预后的主要途径。目前的手术、光动力学及

激光治疗存在移植物排斥、NV 复发、损伤周围正常组织的缺点; 部分生物制剂在动物模型获得较好疗效, 但由于蛋白提纯及产量的限制目前尚未能在临床应用; 某些药物如反应停全身应用能有效地减少角膜 NV 形成, 但毒副作用大。因此角膜 NV 形成仍是目前临床治疗的难题。

角膜新生血管形成是一个极其复杂的生物学过程, 大量的血管形成调节因子, 包括血管形成因子、抗血管形成因子、细胞外基质、炎症介质等参与其中。NV 形成需要内皮细胞侵入、细胞外基质降解、细胞因子活化 3 个主要过程, MMPs 是重要的调节因子。研究发现: 角膜 NV 形成中角膜缘及基质的 MMP-2、VEGF 表达升高<sup>[9]</sup>; 侵入区血管内皮细胞及基质成纤维细胞分泌 MMP-2 及 MMP-9; MMP-9 和 MT-1MMP 基因敲除鼠血管生成延迟<sup>[10,11]</sup>; 将成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2) 缓释药片植入鼠角膜板层诱发血管生成, MMP-9 表达增加, 其增加程度与血管生成度相吻合, 抑制 MMP-9 活性可降低角膜 NV 反应<sup>[12]</sup>。

四环素是人们早已熟悉的抗生素, 临床应用多年, 由于可能影响胎儿及儿童牙和骨的生长发育, 其抗菌活性已被其他抗生素所取代。1983 年 Golub 等首次报道四环素类具有抑制基质金属蛋白酶降解胶原的功效<sup>[13,14]</sup>, 它有较强的  $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  结合能力, 与 MMPs 酶活性中心的金属离子结合形成螯合物, 消除了 MMPs 的催化活性位点, 进而抑制了 MMPs 降解胶原等细胞外基质<sup>[15]</sup>。强力霉素的副作用与毒性在四环素类中最低, 但结合锌离子能力却最强, 是目前临床可应用的活性最强的 MMPs 抑制剂<sup>[9]</sup>。

目前国内外尚未见强力霉素抑制角膜 NV 的报道。眼碱性化学伤诱导鼠眼角膜 NV 形成是研究角膜 NV 形成机理及治疗的常用动物模型。本研究新生血管长度、新生血管面积以及新生血管抑制率 3 个指标提示强力霉素有效地抑制了鼠眼化学伤后角膜新生血管形成。从新生血管抑制率来看, 强力霉素对 NV 的抑制作用随用药时间延长而增加, 用药 14 d 后治疗作用趋于稳定。角膜组织透明无血管, 易于观察, 是 NV 研究的良好模型。开展强力霉素抑制角膜 NV 研究, 不仅为角膜 NV 的治疗提供新的可行的治疗方法, 并且将为肿瘤以及全身其他血管性疾病的防治提供有益的帮助。

强力霉素抑制角膜新生血管的作用机理是否

与调节 MMPs 的活性有关,尚待进一步研究证实。但本研究发现治疗组角膜水肿程度较对照组轻,我们推测,强力霉素除了调节 MMPs 酶活性外,还可能通过影响炎症介质而阻止 NV 形成。1949 年, Cogan<sup>[6]</sup> 提出正常角膜组织的紧密度是形成无血管的原因,尽管后来更多的研究表明角膜 NV 形成是多因素参与的复杂过程,但血管扩张、渗漏、炎症介质的介入所导致的角膜水肿、组织疏松,在一定程度上促进 NV 生长。本研究中无论治疗组或对照组,实验鼠仅在伤后第 2 天出现角膜上皮缺损,此后上皮迅速修复,这可能与烧伤区域位于角膜中央,角膜缘干细胞未受损伤有关。前房积血及白内障与眼前段持续存在的炎症反应有关,虽然两组前房积血与白内障发生率存在一定差异,但统计学分析提示差异没有统计学意义,需进一步扩大样本量观察。

强力霉素抑制大鼠 MMPs 活性的有效口服剂量为每天 5~40 mg / kg 不等<sup>[16]</sup>;本研究按 30 mg / (kg·d) 给药,抑制角膜 NV 效果明显;有必要通过动物活体研究,进一步探讨治疗的量效关系及不良反应。

角膜新生血管形成是目前我国主要致盲眼病之一。本研究在国内外首次报道强力霉素能有效地抑制眼化学上诱导的角膜 NV 形成,目前我们正在进行进一步体内外实验以揭示其作用机制,寻找最佳治疗剂量。同时,我们还将探索局部用药的可能性。

#### 参考文献:

- [1] Yamada J, Danab MR, Sotozono C, *et al.* Local suppression of IL-1 by receptor antagonist in the rat model of corneal alkali injury[J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76 (2):161-7.
- [2] Paterson CA, Well JG, Koklitis PA, *et al.* Recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 suppresses alkali-burn-induced corneal ulceration in rabbits [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(2): 677-84.
- [3] Zhang H, Li C, Baciuc PC. Expression of integrins and MMPs during alkali-burn-induced corneal angiogenesis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(4):955-62.
- [4] Kvant A, Saman S, Seregard S, *et al.* expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 70(4):419-28.
- [5] Briest W, Hoizl A, Rasler B, *et al.* Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodeling of rat hearts[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(2): 379-87.
- [6] File RS, Sledge GW Jr, Roth BJ, *et al.* Effects of doxycycline on human prostate cancer cells *in vitro* [J]. *Cancer Letter*, 1998, 127(1):37-41.
- [7] D'Amato RJ, Laughnan MS, Flynn E, *et al.* Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(9): 4082-5.
- [8] 王智崇,徐锦堂,郑通枢. 不同程度性水肿性混浊角膜透光率和吸光度的定量分析[J]. *眼科研究*, 1999, 17 (5): 346-8.
- [9] Kanata A, Saman S, Fagerholm P, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 70(4): 419-28.
- [10] Vu TH, Shipley JM, Bergers G, *et al.* MMP-9/gelatinase-B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes[J]. *Cell*, 1998, 93 (3):411-22.
- [11] Zhou Z, Apte SS, Soininen R, *et al.* Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(8): 4052-7.
- [12] Ohan R, Sivak J, Sbew C, *et al.* Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(14): 10405-12.
- [13] Golub LM, Lee H-M, Lehrer G, *et al.* Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes: preliminary observations and a proposed new mechanism of action[J]. *J Periodontal Res*, 1983, 18(5): 516-26.
- [14] Guerin C, Lathera J, Masnyk T, *et al.* Selective endothelial growth inhibition by tetracyclines that inhibit collagenase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 188(2):740-5.
- [15] Lee CZ, Xu B, Hashimoto T, *et al.* Doxycycline suppresses cerebral matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis induced by focal hyperstimulation of vascular endothelial growth factor in a mouse model [J]. *Stroke*, 2004, 35(7):1715-9.
- [16] Cogan D. Studies on the clinical physiology of the cornea[J]. *Am J Ophthalmol*, 1949, 32(3):625.
- [17] Lamparter S, Slight SH, Weber KT. Doxycycline and tissue repair in rats[J]. *J Lab Clin Med*, 2002, 139(5): 295-302.

(编辑 刘清海)