引文格式:吴艳,叶芬,黄振平. 不同浓度 KH902 对兔碱烧伤后角膜新生血管的抑制作用[J]. 眼科新进展,2016,36(8):720-724. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0191

【实验研究】

不同浓度 KH902 对兔碱烧伤后角膜新生血管的抑制作用△

吴艳 叶芬 黄振平

Inhibitive effects of different concentrations of KH902 eye drops on corneal neovascularization after rabbit corneal alkali burn

WU Yan, YE Fen, HUANG Zhen-Ping

【Key words】 KH902 eye drops; alkali burn; corneal neovascularization; vascular endothelial growth factor

【Abstract】 **Objective** To investigate the inhibitive effects of different concentrations of KH902 eye drops on corneal neovascularization (CNV) after rabbit corneal alkali burn. **Methods** Twenty-four adult rabbits were randomly divided into four groups, alkali burn model was established and divided into four groups, group A was treated with 2.5 mg · mL^{-1} KH902 eye drops, group B with 5 mg · mL^{-1} KH902 eye drops, group C with 10 mg · mL^{-1} KH902 eye drops, and control group with saline solution, 3 times per day. At postoperative 3 days, 7 days, 14 days, 28 days, anterior segment photos were captured, the area of CNV was calculated, the confocal microscopy and pathological examination were given, and the vascular endothelial growth factor (VEGF) was analyzed quantitatively. **Results** CNV could be seen in four groups within 28 days, especially in group D from anterior segment photos. HE staining showed that the corneal epithelial and stromal damage and repair, inflammatory cell infiltration and CNV grow were seen in four groups, but the inflammatory cells were more in group D, and the cube diameter and density of CNV were higher. At postoperative 14 days, 28 days, the inflammatory cell density in group A, B, C were obviously lower than that in group D (all $P<0.01$). At postoperative 7 days, 14 days, 28 days, VEGF concentration in group A, B, C were obviously lower than that in group D (all $P<0.01$); There were significant differences among group A, B, C (all $P<0.01$), except for 28 days between group B and C ($P>0.05$). At postoperative 7 days, 14 days, 28 days, the CNV area in group A, B, C were obviously lower than that in group D (all $P<0.01$), and there was no statistical difference among group A, B, C ($P>0.05$). **Conclusion** KH902 eye drops with different concentrations have inhibitive effects on CNV after rabbit corneal alkali burn, even with lower concentration.

作者简介:吴艳,女,1981 年 12 月出生,江苏常州人,硕士研究生,眼科主治医师,研究方向:角膜病。联系电话:13852292835; E-mail: calinrain@126.com; ORCID: 0000-0001-8649-2058

About WU Yan: Female, born in December, 1981. Master degree. Tel: 13852292835; E-mail: calinrain@126.com; ORCID: 0000-0001-8649-2058

收稿日期:2016-02-15
修回日期:2016-06-06
本文编辑:付中静
△基金项目:南京军区南京总医院科研项目基金资助(编号:2013052)
作者单位:211166 江苏省南京市,南京军区南京总医院眼科
通讯作者:黄振平,E-mail: hzp1963@163.com; ORCID: 0000-0003-3715-2078
Received date: Feb 15, 2016
Accepted date: Jun 6, 2016
Foundation item: Scientific Research Fund of Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of the Chinese PLA (No: 2013052)
From the *Department of Ophthalmology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China*
Responsible author: HUANG Zhen-Ping, E-mail: hzp1963@163.com; ORCID: 0000-0003-3715-2078

【中图分类号】 R772.2
【关键词】 KH902;碱烧伤;角膜新生血管;血管内皮细胞生长因子

【摘要】 **目的** 观察不同浓度 KH902 对兔碱烧伤后角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)的抑制作用。**方法** 取成年新西兰兔 24 只,建立兔碱烧伤模型,将兔随机分为 4 组,使用 KH902 眼用注射剂(康柏西普)配置不同浓度的 KH902,A 组 2.5 mg · mL^{-1},B 组 5 mg · mL^{-1},C 组 10 mg · mL^{-1},D 组为对照组(生理盐水),均为每日滴眼 3 次。分别在制模后 3 d、7 d、14 d、30 d 拍摄眼前节照片,观察 CNV 情况并行角膜激光共焦显微镜检查,并计算 CNV 面积。观察各组处死兔常规病理和 VEGF 表达情况。**结果** 在制模后 28 d 内,四组 CNV 形成,其中 D 组 CNV 较 A、B、C 组生长明显;对各组切片进行观察发现,四组均出现了角膜上皮及基质细胞的损失和修复、炎性细胞的浸润和 CNV 的生长,但 D 组的炎性细胞较密集,CNV 管径和密度较高。制模后 14 d、28 d,A、B、C 组炎性细胞密度较 D 组均显著减少(均为 $P<0.01$);在制模后 7 d、14 d、28 d,A、B、C 组较 D 组 VEGF 表达明显减少;A、B、C 三组进行组间比较,仅制模后 28 d 时 B、C 组间差异均无统计学意义($P>0.05$),其余差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$);制模后 7 d、14 d、28 d,A、B、C 三组均较 D 组 CNV 面积减少,差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$),而三组组间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 不同浓度的 KH902 对兔碱烧伤后的 CNV 均有抑制作用,低浓度的 KH902 即可产生明显的抑制作用。

角膜生理状态下是一个无血管的透明组织,但是由于感染、炎症、变性、局部缺血缺氧、创伤、角膜缘干细胞屏障的破坏等原因常导致新生血管侵入[1]。角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)是目前全球范围内主要的致盲眼病之一,也是角膜移植排斥反应发生的高危因素。CNV 的形成机

制尚未完全清楚，目前认为 CNV 的生长是一个复杂的过程，受多种因素的综合调控，但临床上尚没有一种比较有效的药物能对 CNV 的生长有较好的阻滞作用。现有研究发现血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）是 CNV 发展过程中非常关键的因子[2-5]，对 CNV 形成的多个阶段和途径产生影响。角膜碱烧伤是 CNV 产生的一个重要原因，已有研究表明，碱烧伤后，VEGF 大量增多，促进了 CNV 的产生，目前碱烧伤模型是研究 CNV 的常见动物模型之一。本研究通过建立兔的碱烧伤模型，研究新型 VEGF 抑制药物——KH902 眼用注射液（康柏西普）对于 CNV 的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组 健康新西兰兔 48 只，体质量 2.0～2.5 kg，雌雄比例 1∶1，并经眼部检查排除外眼和眼底疾患，均由南京军区南京总医院比较医学科提供。将兔随机分为 4 组，分别予以不同的滴眼液滴眼：A 组康柏西普 2.5 mg·mL^{-1}，B 组康柏西普 5.0 mg·mL^{-1}，C 组康柏西普 10.0 mg·mL^{-1}，D 组生理盐水，均为每日滴眼 3 次，共 2 周。

1.2 主要试剂与仪器 小鼠抗兔 VEGF 单克隆抗体购自美国 R &D 公司，KH902 眼用注射液（康柏西普）购自成都康弘生物科技有限公司。所有图像数据的分析系统通过图像分析软件（Image-Pro Plus 6.0）进行分析处理。共聚焦显微镜采用海德堡激光共焦显微镜角膜模块进行（德国海德堡公司生产）。

1.3 兔碱烧伤模型的建立 用 100 g·L^{-1}水合氯醛（3 mL·kg^{-1}）腹腔注射麻醉，10 g·L^{-1}奥布卡因滴眼液表面麻醉，将直径为 3 mm 圆形滤纸在 1 mol·L^{-1} NaOH 中充分浸透 20 s，取出滤纸，吸去多余滤液，贴于角膜中央烧灼 30 s，移去滤纸后立即用 30 mL 无菌生理盐水冲洗结膜囊，复方托吡卡胺散瞳（每日 3 次）。

1.4 制模后 CNV 的观察 兔碱烧伤后，每日利用裂隙灯显微镜观察 CNV 的形成及发生情况，直至各组均出现 CNV 后，改为隔日观察。制模后 7 d、14 d、28 d 均测量自角膜缘长出的 CNV 长度和累及的圆周钟点数（显微镜下用钢尺和圆规测量）。应用 Robert 计算机数学模型公式计算 CNV 面积：$A = C/12 \times 3.14[r^2-(r-l)^2]$，其中 C 为 CNV 累及角膜的圆周钟点数，l 即所取的血管长度，兔角膜半径 r 为 7 mm。CNV 总面积等于 4 个象限面积之和。分别于 7 d、14 d、28 d 记录 CNV 长度并画图计算面积。同时拍照记录（TOPCON，TRC NW200）以做对照。

1.5 组织病理学观察

1.5.1 常规病理 选择碱烧伤 7 d、14 d、28 d 处死兔的角膜组织标本，进行石蜡切片，苏木精-伊红染色后光学显微镜下观察角膜损伤及炎症反应情况。

1.5.2 共聚焦显微镜检查 本实验采用海德堡激光共聚焦显微镜角膜模块进行。将实验兔麻醉后，开睑器开睑，滴用透明质酸钠眼用凝胶。调整操纵台高度和 CCD 摄像头位置，在物镜头表面滴 1 滴透明质酸钠眼用凝胶，盖上一次性无菌角膜接触帽。将兔眼固定于物镜上，观察角膜各层细胞的数量和形态，并同步拍摄图片。观察视野为 400 μm×400 μm，分辨率为 1 μm，放大倍数为 800 倍。每个实验对象选取三张清晰的角膜基质图像，利用仪器自带的细胞密度测算程序，对炎性细胞密度进行测算，取平均值为炎性细胞密度。所有结果均取三张典型图片，计算后取其平均值后进行统计学分析。

1.5.3 VEGF 表达 烧伤后 7 d、14 d、28 d 处死实验兔，取整个角膜组织，做 4 μm 石蜡切片。石蜡切片脱蜡，体积分数 30% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶，0.01 mmol·L^{-1}枸橼酸盐缓冲液高压抗原修复，滴加封闭用正常山羊血清工作液，血清封闭。一抗湿盒中 4 ℃过夜，二抗室温下孵育 15 min。DAB 显色，苏木素复染、脱水、透明、封片，光镜下观察。细胞质内或核膜上呈棕黄色者为阳性，仅细胞核着蓝色者为阴性。应用 Image-Pro Plus6.0 软件选取相同的棕黄色作为判断所有照片阳性的统一标准，对每张照片进行分析得出阳性的积分光密度值（IOD）。IOD 值越大，阳性表达越强。

1.6 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析。计量资料采用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。所有数据在完成方差齐性检验后进行重复测量方差分析，多个样本均数间采用两两比较的 SNK-q 检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学改变 碱烧伤后，所有角膜中央区出现瓷白色混浊，周边少量透明角膜组织，分界线不清。制模后 7 d，A、B 组上方 1～2 个象限出现细小新生血管长入，B 组较 A 组血管少、细；C 组可见少量新生血管侵犯角膜缘；D 组新生血管较明显。制模后 14 d，C 组少量新生血管长入，血管直径细，分支少；A、B 组出现新生血管 360°向心性生长，其中 3 眼侵犯角膜中央区；D 组血管粗大，均侵犯中央角膜，其中 6 眼出现角膜中央区溃疡，溃疡较深、较大，其中 2 眼出现角膜穿孔，溃疡表面覆盖黄白色分泌物；A 组 4 眼出现浅溃疡，无明显黄白色分泌物覆盖；B、C 组均未见明显溃疡生成。制模后 28 d，C 组可见新生血管侵犯中央角膜区，血管较细、稀疏，C 组无角膜溃疡生成；D 组共 8 眼出现角膜溃疡，3 眼出现角膜穿孔，全角膜可见粗大 CNV 向心性生长；A 组 5 眼出现浅溃疡，未出现穿孔角膜；B、C 组无角膜溃疡形成（图 1）。

2.2 常规病理 制模后 7 d，四组的角膜均出现上皮细胞肿胀，烧伤区可见部分上皮细胞缺如，细小点状炎性细胞浸润，未见前弹力层结构，近角膜缘处浅

基质层可见 CNV 管腔,管径较小,其中 D 组见上皮细胞水肿更明显,炎性细胞浸润范围更大。制模后 14 d,角膜上皮细胞肿胀,细胞间隙扩大,但上皮层缺如减少,基质层纤维肿胀较前加重,均可见大量炎性细胞浸润,基质层内可见新生血管,管腔内可见血细胞,但 A、B、C 组的管腔直径和密度均小于 D 组,部分 D 组角膜中央出现组织坏死(图 2)。制模后 28 d,A、B、C 组角膜上皮细胞均较完整,上皮层及基质层水肿消退,基质层见新生血管管腔,其中 C 组管腔较小,炎性细胞较前减少明显,D 组仍可见上皮及基质层的水肿及炎性细胞浸润。

2.3　共聚焦显微镜表现　制模后 7 d,四组角膜上皮层均缺如,基质细胞纤维改变以肿胀为主,细胞核呈高反光,炎性细胞浸润较少见。其中 A、B、C 组未见明显 CNV 浸润,而 D 组周边可见 CNV 管腔。制模后 14 d,四组角膜上皮细胞水肿减退,基质细胞肿胀较前减轻,基质层纤维结构出现重构,均出现 CNV 的不同程度生长,A、B、D 组中央区出现 CNV,C 组的中央角膜未见 CNV;炎性细胞的浸润仅出现在 D 组,而 A、B、C 组均未见。制模后 28 d,A、B、C 组上皮层均可见,基质层水肿减退,中央区的 CNV 出现不同程度减少,D 组仍可见部分区域的上皮缺损,基质层仍见炎性细胞浸润,但较前减少,中央区 CNV 密集(图 3)。

图 1　制模后 28 d 各组眼前节照相。A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。A、B、C 组 CNV 较 D 组明显减少,D 组可见大量 CNV 长入,并出现角膜溃疡及睑球粘连

图 2　制模后 14 d,角膜组织苏木精-伊红染色(×200)。A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。四组均可见血管内壁形成,炎性细胞浸润,数量 D 组 > A 组 > B 组 > C 组,基质层细胞可见水肿,其中 D 组水肿较重。B、C 组的基质层水肿均较轻,而 C 组仅见少量炎性细胞浸润

图 3　制模后 28 d,共焦显微镜下角膜组织结构(400 μm × 400 μm)。A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。四组均可见基质的瘢痕化,炎性细胞浸润明显减少,而粗大的 CNV 形成明显,血管内可见血细胞流动,其中 D 组粗大血管多见

对各时间点的四组炎性细胞密度(表 1)进行方差齐性检验,符合方差齐性,结果发现,制模后 7 d,四组的炎性细胞浸润较少,差异无统计学意义(F = 0.42,P = 0.741 1),四组间两两比较,差异均无统计学意义(Q_{7AB} = 0.967 3,Q_{7AC} = 0.396 0,Q_{7AD} = 0.565 6,Q_{7BC} = 0.571 3,Q_{7BD} = 1.532 9,Q_{7CD} = 0.961 6,均为 $P > 0.05$)。制模后 14 d,四组炎性细胞密度相比差异有统计学意义(F = 1495.92,P = 0.000 0),四组间两两比较,差异均有统计学意义(Q_{14AB} = 15.005 4,Q_{14AC} = 23.379 7,Q_{14AD} = 62.101 4,Q_{14BC} = 8.374 3,Q_{14BD} = 77.106 8,Q_{14CD} = 85.481 2,均为 $P < 0.01$)。制模后 28 d,四组炎性细胞密度相比差异有统计学意义(F = 137.85,P = 0.000 0),四组间两两比较,A、B、C 组与 D 组差异均

有统计学意义（$Q_{28AD}=21.985\ 3$，$Q_{28BD}=23.719\ 1$，$Q_{28CD}=24.464\ 6$，均为$P<0.01$），A、B、C 组间差异均无统计学意义（$Q_{28AB}=1.733\ 8$，$Q_{28AC}=2.479\ 3$，$Q_{28BC}=0.745\ 5$，均为 $P>0.05$）。

2.4 VEGF 表达 在制模后 7、14、28 d 对角膜标本的 VEGF 含量进行测定（表 2）。结果发现，无药物干预下，VEGF 含量的峰值出现在制模后 14 d（图 4），之后 2 周虽停用药物干预，VEGF 含量仍出现下降。在各个时间点对四组进行方差齐性检验，结果均符合方差齐性，然后进行方差分析发现，在各个时间点，各组总体均数均不相等（$F_7=4450.73$，$F_{14}=7167.03$，$F_{28}=1470.60$，$P<0.01$）。再对组间进行样本均数的两两比较，结果发现仅 28 d 时 B、C 组间差异无统计学意义（$Q_{28BC}=0.593\ 6$，$P>0.05$），其余各组间差异均有统计学意义（$Q_{7AB}=37.540\ 7$，$Q_{7AC}=53.861\ 1$，$Q_{7AD}=95.106\ 8$，$Q_{7BC}=16.320\ 4$，$Q_{7BD}=132.647\ 5$，$Q_{7CD}=148.967\ 9$；$Q_{14AB}=306.925\ 5$，$Q_{14AC}=402.356\ 7$，$Q_{14AD}=321.067\ 8$，$Q_{14BC}=95.431\ 3$，$Q_{14BD}=627.993\ 2$，$Q_{14CD}=723.424\ 5$；$Q_{28AB}=19.461\ 6$，$Q_{28AC}=20.055\ 2$，$Q_{28AD}=61.226\ 4$，$Q_{28BD}=80.688\ 0$，$Q_{28CD}=81.281\ 6$；均为 $P<0.01$）。

表 1 各组角膜组织的炎性细胞密度

（细胞密度/μm^{-2}）

组别	7 d	14 d	28 d
A	21.32 ± 6.71	738.22 ± 51.42	72.96 ± 21.33
B	19.61 ± 5.00	522.00 ± 41.98	61.03 ± 19.74
C	20.62 ± 8.12	401.33 ± 67.72	55.90 ± 20.54
D	22.32 ± 3.75	1633.07 ± 31.21	224.24 ± 31.72

表 2 各组角膜组织的 VEGF 含量 （IOD）

组别	7 d	14 d	28 d
A	4899.145 ± 32.345	6158.007 ± 39.557	1138.416 ± 37.876
B	4379.369 ± 46.980	2996.099 ± 29.003	955.332 ± 28.021
C	4153.402 ± 52.099	2012.978 ± 21.229	949.748 ± 19.119
D	6215.961 ± 56.869	9465.607 ± 47.303	1714.399 ± 40.776

图 4 制模后 14 d，角膜组织 VEGF 免疫组织化学染色（×200）。A：A 组；B：B 组；C：C 组；D：D 组

2.5 CNV 利用图像分析软件（Image-Pro Plus 6.0）计算 7 d、14 d、28 d 的 CNV 面积（表 3），结果发现，无药物干预下，各组 CNV 面积的峰值出现在制模后 14 d，14 d 后虽然停止用药，但 CNV 面积仍出现进一步下降。在各个时间点对四组进行方差齐性检验，结果均符合方差齐性，然后进行方差分析发现，在各个时间点，各组总体均数均不相等（$F_7=37.25$，$F_{14}=119.70$，$F_{28}=101.38$，$P<0.01$）。再对组间进行样本均数的两两比较，A、B、C 组与 D 组差异均有统计学意义（$Q_{7AD}=10.249\ 6$，$Q_{7BD}=12.685\ 0$，$Q_{7CD}=12.949\ 8$，$Q_{14AD}=19.808\ 8$，$Q_{14BD}=21.957\ 8$，$Q_{14CD}=23.306\ 8$，$Q_{28AD}=18.464\ 4$，$Q_{28BD}=20.677\ 1$，$Q_{28CD}=20.908\ 0$，均为$P<0.01$），而 A、B、C 组间差异无统计学意义（$Q_{7AB}=2.435\ 4$，$Q_{7AC}=2.700\ 2$，$Q_{7BC}=0.264\ 8$，$Q_{14AB}=2.149\ 0$，$Q_{14AC}=3.498\ 0$，$Q_{14BC}=1.349\ 0$，$Q_{28AB}=2.212\ 7$，$Q_{28AC}=2.443\ 5$，$Q_{28BC}=0.230\ 8$，均为 $P>0.05$）。

表 3 各组 CNV 面积 （S/mm^2）

组别	7 d	14 d	28 d
A	11.344 ± 4.561	16.679 ± 6.971	14.314 ± 4.011
B	8.521 ± 2.908	12.902 ± 5.460	11.256 ± 3.450
C	8.214 ± 2.791	10.531 ± 4.232	10.937 ± 4.001
D	23.225 ± 5.239	51.494 ± 7.208	39.832 ± 6.905

3 讨论

正常角膜是一个无血管和淋巴管的组织，角膜的这种无血管化的特性对其维持透明性和视觉质量至关重要。当角膜受到外力、微生物、化学制剂等外界因素侵犯时，其无血管化会遭到破坏。CNV 是破坏角膜透明性的重要原因。另外，由于 CNV 化增加了角膜移植的风险程度，保持角膜的无血管化对提高角膜移植的成功率也很重要。近年来对抗新生血管化的研究获得了突飞猛进的发展，新型抗血管化药物目前已成功用于肿瘤和视网膜脉络膜新生血管疾病的治疗。碱烧伤是造成大面积 CNV 形成的重要原因。目前认为，CNV 的形成与 VEGF 的过度表达密切相关。在炎症性角膜血管化时，上皮细胞和内皮细胞中的 VEGF 表达显著增加，特别是在瘢痕组织的成纤维细胞和巨噬细胞周围[6]。VEGF 与 VEGFR 结合后，VEGFR 发生自磷酸化，继而激活磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C，后者水解磷脂酰肌醇二磷酸，产生二磷脂甘油和三磷酸肌醇，激活细胞质中的蛋白激酶 C，并固定于细胞膜上，诱导内皮细胞的生长，增加血管通透性[6]。VEGF 家族的成员与不同的受体结合产生不同的作用。

在本实验中，我们通过建立家兔的角膜碱烧伤

模型,使用 KH902 眼液对碱烧伤后的 CNV 生长进行抑制。前期的研究发现,用贝伐单抗进行结膜下注射或直接滴眼,能在一定程度上减少 CNV 的形成[7-11]。本实验所选取的 KH902 注射剂(康柏西普)是新一代抗 VEGF 药物。KH902 的作用机制是:通过直接结合并中和 VEGF,以降低血液中游离的 VEGF 含量,阻止 VEGF 与血管内皮细胞表面的受体相互作用引起的信号传递,达到治疗由新生血管生长引起的多种疾病的目的。与贝伐单抗仅拮抗 VEGF-A 不同,它能同时作用于 VEGFR1 和 VEGFR2 这两个表达于血管内皮细胞的受体,从而直接或间接对所有 VEGF 家族成员产生抑制作用,以达到更高的抗 VEGF 作用。李宇等[12]发现,定期结膜下注射 KH902 能抑制大鼠 CNV 的生长。

但是,定期结膜下注射对患者结膜的刺激性较大,同时增加了患者的就医负担。那么,在临床上更便捷、使用更方便、损伤更小的滴眼液能否达到更好的效果呢? 本研究结果发现,在使用不同浓度的 KH902 后,动物模型的 CNV 出现不同程度的抑制。取制模后 7 d、14 d、28 d 三个时间点的 VEGF 浓度进行测量,结果发现,三个浓度治疗组的 VEGF 表达较对照组均有明显减少,而对三个治疗组进行组间两两比较,结果发现,仅 28 d 时 B、C 组间差异无统计学意义($P>0.05$),其余各组间差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$)。说明随着 KH902 浓度的升高,其抗 VEGF 表达的作用逐渐增强。同时,对制模后 7 d、14 d、28 d 的炎性细胞密度进行测算,结果发现,制模后 14 d、28 d,三个治疗组的炎性细胞密度显著降低,表明 KH902 对炎性细胞有一定的抑制作用。但是,对以上三个时间点的 CNV 面积进行测算,结果发现,虽然三个治疗浓度下 CNV 面积均较对照组明显减少(均为 $P<0.01$),并且随着浓度的增加,CNV 的面积出现了减少的趋势,但三个治疗组之间进行两两比较后,发现这种面积的减少差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究结果表明,可能是因为碱烧伤后的 CNV 生长是一个多因素共同作用的结果,而 VEGF 仅是其中重要的一环,不同浓度的 KH902 对其他炎性因子和细胞通路的影响,还需进一步的研究。

已有研究表明抗 VEGF 药物对抑制 CNV 生成和使已有 CNV 回退有明显效果。但其抑制效果具有极大的个体差异性。产生个体差异性的原因中一个很重要的因素是抗 VEGF 药物的剂量问题。目前仍需要长期随机对照实验来明确其浓度依赖性。本研究利用不同浓度的抗 VEGF 药物,对碱烧伤后 CNV 的抑制效果进行观察,结果发现,随着抗 VEGF 药物浓度的增高,对 VEGF 的表达的抑制作用逐渐增强,但低浓度的抗 VEGF 药物,即能起到较好的抗 CNV 生长的作用。目前临床上的抗 VEGF 药物较为昂贵,因此,使用低浓度的抗 VEGF 药物,即能对患者起到良好的治疗作用。

当然,对于 KH902 注射剂治疗 CNV 的研究效果及机制仍存在许多空白,需要进一步的研究探索。

参考文献

[1] CHANG JH, GABISON EE, KATO T, AZAR DT. Corneal neovascularization[J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2001, 12(4): 242-249.

[2] FOLKMAN J. Angenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. *Nat Med*, 1995, 1(1): 27-31.

[3] PHILIPP W, SPEICHER L, HUMPEL C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(9): 2514-2522.

[4] KVANTA A, SARMAN S, FAGERHOLM P, SEREQARD S, STEEN B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor[J]. *Exp Eye Res*, 2000, 70(4): 419-428.

[5] CURSIEFEN C, RUMMELT C, KüCHLE M. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor alpha, and transforming growth factor beta1 in human corneas with neovascularization[J]. *Cornea*, 2000, 19(5): 526-533.

[6] OTROCK ZK, MAKAREM JA, SHAMSEDDINE AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 38(3): 258-268.

[7] OZDEMIR O, Altintas O, Altintas L, YILDIZ DK, Sener E, Caglar Y. Effects of subconjunctivally injected bevacizumab, etanercept, and the combination of both drugs on experimental corneal neovascularization[J]. *Can J Ophthalmol*, 2013, 48(2): 115-120.

[8] KOBY, KIMYS, BAEK SG, LEE GW, KIM JM, JEAN WS, *et al*. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival and topical bevacizumab and sunitinib in a rabbit model[J]. *Cornea*, 2013, 32(5): 689-695.

[9] HASHEMIAN MN, MEHRJARDI HZ, MOGHIMI S, TAHVILDARI M, MOJAZIAMIRI H. Prevention of corneal neovascularization: comparison of different doses of subconjunctival bevacizumab with its topical form in experimental rats[J]. *Ophthalmic Res*, 2011, 46(1): 50-54.

[10] 王军花,高桂平. Avastin 不同给药途径对兔角膜新生血管及超微结构的影响[J]. 眼科新进展, 2012, 32(5): 427-431.

[11] 常岩,蔡莉,王雨生,王海燕,李曼红. 贝伐单抗眼液对兔眼角膜新生血管抑制作用的实验研究[J]. 眼科新进展, 2010, 30(7): 605-611.

[12] 李宇,邓应平,张明,唐静,孟丹. KH902 抑制大鼠角膜新生血管的实验研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2013: 44(1): 64-67.