

引文格式:温舒,杨炜. 氢气水对大鼠碱烧伤角膜新生血管抑制作用的研究[J]. 眼科新进展,2018,38(1):39-43.  
doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0008

【实验研究】

# 氢气水对大鼠碱烧伤角膜新生血管抑制作用的研究

温舒 杨炜

## Inhibitory effects of hydrogen on corneal neovascularization in rats with alkali burn

WEN Shu, YANG Wei

【Abstract】 Objective To observe the inhibitory effects of hydrogen on corneal neovascularization (CNV) induced by alkali burn in rats and its underlying mechanisms

Methods A total of 48 SPF-grade SD rats (48 eyes) were selected and randomly divided into blank group, control group and treatment group. Then the model of CNV was established successfully induced by alkali burn in these animals. The treatment group was given  $1.6 \times 10^{-6}$  hydrogen eye drops, the control group received tobramycin dexamethasone eye drops, and blank group left untreated. And CNV length was measured on day 1, 3, 7 and 14 after model establishment, followed by calculation of the CNV area. The corneal and aqueous humor of the rats was removed on day 14 after alkali burn. Then PEDF protein was detected by immunohistochemical staining, and RT-PCR was used to detect the expression of PEDF mRNA in the cornea. Additionally, TNF- $\alpha$  in the aqueous humor was detected by enzyme e-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results The area of corneal neovascularization on day 3, 7 and 14 after alkali burn was  $(3.26 \pm 1.82) \text{ mm}^2$ ,  $(8.59 \pm 3.98) \text{ mm}^2$  and  $(3.24 \pm 2.34) \text{ mm}^2$  in the treatment group, respectively,  $(4.27 \pm 2.68) \text{ mm}^2$ ,  $(6.44 \pm 4.67) \text{ mm}^2$  and  $(15.98 \pm 4.75) \text{ mm}^2$  in the control group, respectively,  $(9.49 \pm 2.79) \text{ mm}^2$ ,  $(17.71 \pm 4.06) \text{ mm}^2$  and  $(25.35 \pm 1.40) \text{ mm}^2$  in blank group, respectively. The CNV areas of the treatment group and the control group were less than that of the blank group on day 3, 7 and 14 after alkali burn, and the differences were statistically significant (all  $P < 0.01$ ), but there was no significant difference between the treatment group and the control group on day 3, 7 after alkali burn ( $P > 0.05$ ), while the area of the treatment group was significantly less than that of the control group on 14th day, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). On day 14 after alkali burn, the results of immunohistochemistry showed that the expression of PEDF protein in corneal epithelium was significantly increased in the treatment group than that in the control group and the blank group, and there were few new blood vessels in the stromal layer. RT-PCR results showed that the expression of PEDF mRNA in the treatment group was significantly higher than that in the control group and the blank group, and the difference was statistically significant (all  $P < 0.01$ ). ELISA results showed that the content of TNF- $\alpha$  protein in the treatment group was significantly lower than that in the control group and the blank group, and the difference was statistically significant (all  $P < 0.01$ ). Conclusion  $1.6 \times 10^{-6}$  hydrogen eye drops can effectively inhibit the corneal neovascularization which induced by alkali burn in rats.

【Key words】 hydrogen; corneal neovascularization; pigment epithelium-derived factor; tumor necrosis factor- $\alpha$

【摘要】 目的 研究氢气水( $\text{H}_2$ 水)滴眼对大鼠碱烧伤诱导角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)的抑制作用并探讨 $\text{H}_2$ 水抑制CNV的机制。方法 SPF级SD大鼠48只48眼,成功建立碱烧伤诱导CNV模型,随机分为空白组、对照组和治疗组。治疗组给予 $1.6 \times 10^{-6}$   $\text{H}_2$ 水滴眼,对照组给予妥布霉素地塞米松眼液滴眼,空白组不做任何处理。分别在模型建立后第1天、第3天、第7天、第14天测量CNV长度,计算CNV面积。碱烧伤后第14天深麻醉下取大鼠角膜及房水,免疫组织化学染色法检测角膜组织中PEDF蛋白表达,RT-PCR法检测角膜组织中PEDF mRNA表达,ELISA检测房水中TNF- $\alpha$ 蛋白表达。结果 角膜碱烧伤后第3天、第7天、第14天,治疗组新生血管面积分别为 $(3.26 \pm 1.82) \text{ mm}^2$ 、 $(8.59 \pm 3.98) \text{ mm}^2$ 和 $(3.24 \pm 2.34) \text{ mm}^2$ ;对照组分别为 $(4.27 \pm 2.68) \text{ mm}^2$ 、 $(6.44 \pm 4.67) \text{ mm}^2$ 和 $(15.98 \pm 4.75) \text{ mm}^2$ ;空白组分别为 $(9.49 \pm 2.79) \text{ mm}^2$ 、 $(17.71 \pm 4.06) \text{ mm}^2$ 和 $(25.35 \pm 1.40) \text{ mm}^2$ 。碱烧伤后第3天、7天和14天,治疗组和对照组均小于空白组,差异均有显著统计学意义(均为 $P < 0.01$ );碱烧伤后第3天和第7天,治疗组与对照组差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$ );碱烧伤后第14天治疗组明显小于对照组,差异具有显著统计学意义( $P < 0.01$ )。碱烧伤后第14天,免疫组织化学染色结果显示,治疗组角膜上皮层PEDF蛋白表达较对照组和空白组明显增强,基质层新生血管极少;RT-PCR检测结果显示,治疗组PEDF mRNA表达明显高于对照组和空白组,差异均有显著统计学意义(均为 $P < 0.01$ );ELISA检测结果显示,治疗组房水中TNF- $\alpha$ 蛋白含量明显低于对照组与空白组,差异均有显著统计学意义(均为 $P < 0.01$ )。结论  $1.6 \times 10^{-6}$   $\text{H}_2$ 水滴眼能有效抑制大鼠碱烧伤诱导的CNV。

【关键词】 氢气水;角膜新生血管;色素上皮衍生因子;肿瘤坏死因子- $\alpha$

【中图分类号】 R772.2

角膜是眼屈光间质的重要组成部分,它的无血管状态是维持角膜透明性的重要因素。但在严重的化学烧伤、炎症、感染、缺氧等损伤下,会产生角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV),不仅可导致免疫性角膜病的发生,也是角膜移植手术后发生免疫排斥反应的高危因素,且 CNV 常因出血渗出及继发纤维化等导致角膜失去正常的透明性,引起视力减退甚至失明。在发达国家,新生血管性眼病是致盲性疾病的首要原因。在发展中国家,眼外伤尤其是眼部化学伤及热烫伤极其常见,发病率远高于欧美等发达国家。尽管目前治疗方法很多,但仍缺乏十分理想的治疗药物。最新的基础和临床研究揭示氢气水( $H_2$  水)是细胞和器官重要的生理性调节因子。已有研究表明, $H_2$  水对眼病的治疗<sup>[1]</sup>如视网膜新生血管病变、糖尿病视网膜病变、视网膜缺血-再灌注损伤、化学烧伤及光损伤等方面都有新进展。本实验主要研究  $H_2$  水对大鼠碱烧伤诱导的 CNV 的抑制作用,探讨在  $H_2$  水干预条件下肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 及色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)的变化。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、药物和试剂** SPF 级健康成年 SD 大鼠 48 只(48 眼),均为右眼,雄性,体质量( $200 \pm 20$ )g,购自新疆维吾尔自治区实验动物研究中心。 $1.6 \times 10^{-6} H_2$  水(北京活力氢源生物科技有限公司),妥布霉素地塞米松滴眼液(典必殊,美国爱尔康公司比利时分公司),水合氯醛(天津化学试剂厂),Trizol 核酸蛋白提取试剂(美国 Life-Invitrogen 公司),cDNA 合成试剂盒(美国 Thermo-Fermentas 公司),荧光定量 PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司),免疫组织化学 Anti-PEDF 抗体(美国 Abcam 公司),大鼠 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(伊莱瑞特生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 碱烧伤诱导 CNV 模型** 健康成年大鼠,称体质量后采用  $100 g \cdot L^{-1}$  水合氯醛( $3 mL \cdot kg^{-1}$ )腹腔注射麻醉,麻醉起效,托吡卡胺滴眼液散瞳,眼前段裂隙灯照相,排除眼前段病变。奥布卡因滴眼液滴眼 3 次行表面麻醉,吸干眼表,夹取统一规格直径 3 mm 单层滤纸,将  $4 \mu L$  的  $1 mol \cdot L^{-1}$  NaOH 溶液滴于滤纸 90 s,使其达饱和状态,吸除结膜囊多余液体,将滤纸片置于大鼠角膜中央,计时 40 s,取下,立即用 30 mL 生理盐水冲洗结膜囊。模型成功标准:角膜基质层水肿、混浊明显,虹膜隐约可见。排除碱烧伤后发生角膜感染、穿孔和前房严重积血的大鼠。48 只大鼠建模成功。

**1.2.2 实验分组和给药方法** 碱烧伤诱导 CNV 模型 48 眼,随机分为治疗组、对照组和空白组,每组各 16 眼。治疗组给予  $1.6 \times 10^{-6} H_2$  水滴眼;对照组给

予妥布霉素地塞米松眼液滴眼,均为每次 1 滴(约  $10 \mu L$ ),每天 4 次,连续给药 14 d。空白组不做任何处理。

**1.2.3 CNV 面积计算及定量分析** 分别于碱烧伤后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天散瞳,采用裂隙灯显微镜数字图像处理系统,对右眼进行观察并照相。根据照片测量并记录新生血管长度:以大鼠角膜缘 9~3 点钟位划一横线,再由 12~6 点钟位划垂直线,这两条线将角膜分为 4 个象限,采用 Digimize Image Analysis 软件测量各象限内最长的一支血管长度(以连续且弯曲度小、并与角膜缘切线垂直的新生血管长度为准)。计算 CNV 面积:根据 Robert 公式  $S = C/12 \times 3.1416 \times [r^2 - (r-l)^2]$ ,其中  $S$  为 CNV 面积, $C$  为 CNV 网的跨圆周钟点数, $r$  为角膜半径约 3 mm, $l$  为新生血管长度。

**1.2.4 免疫组织化学染色检测 PEDF 蛋白表达** 碱烧伤后第 14 天,深麻醉无菌条件下沿角膜缘剪下角膜组织,置  $40 g \cdot L^{-1}$  多聚甲醛中固定,石蜡包埋。垂直于角膜表面连续  $5 \mu m$  切片。采用 SP 法检测角膜组织中 PEDF 蛋白的表达。常规脱蜡,EDTA 抗原修复(pH = 8.0),95 °C 修复 15 min,体积分数 3%  $H_2O_2$  阻断内源性过氧化物酶。滴加山羊血清室温封闭,滴加 PEDF 单克隆抗体一抗(1:200),室温孵育 2.5 h,滴加生物素标记的二抗和 SP 溶液,DAB 显色,苏木素复染,脱水透明后中性树胶封片,光学显微镜下观察并拍片。染色结果判断:以细胞膜和(或)细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞。以正常角膜组织 PEDF 表达为阴性对照。

**1.2.5 RT-PCR 检测 PEDF mRNA 表达** 碱烧伤后第 14 天,深麻醉无菌条件下沿角膜缘剪下角膜组织,Trizol 法提取总 RNA,  $10 g \cdot L^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪下观察目的条带,可明显观察到 18 S 和 28 S 两条带,28 S 大约是 18 S 的两倍宽。将  $5 \mu L$  总 RNA 反转录成 cDNA 后扩增。PCR 反应条件为 95 °C 2 min,95 °C 5 s,60 °C 31 s。PEDF 和  $\beta$ -actin 均为 40 个循环。利用荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中每一个循环扩增产物的变化,通过  $C_t$  值对起始模板进行相对定量分析。

### 1.2.6 酶联免疫吸附实验检测房水中 TNF- $\alpha$ 含量

碱烧伤后第 14 天,深麻醉无菌条件下抽取房水。加样:分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液  $100 \mu L$ ,余孔分别加标准品和待测样品  $100 \mu L$ ,37 °C 孵育 90 min。包被抗体:弃去液体,甩干,每孔加入生物素化抗体工作液  $100 \mu L$ ,酶标板加上覆膜,37 °C 温育 1 h;弃去孔内液体,甩干,洗板 3 次,每次浸泡 1~2 min,大约每孔  $350 \mu L$ ,甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干;每孔加酶结合物工作液  $100 \mu L$ ,加上覆膜,37 °C 温育 30 min,弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次。显色:每孔加底物溶液(TMB)  $90 \mu L$ ,酶标板加上覆膜 37 °C 避光孵育 15

min 左右,当标准孔出现明显梯度时即可终止,每孔加终止液 50  $\mu$ L,终止反应,此时蓝色立转黄色。检测:酶标仪在 450 nm 波长测量各孔吸光度(A)值。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计学软件分析数据,所有数据均以均数  $\pm$  标准差表示,三组不同时间点 CNV 面积、PEDF mRNA 表达和 TNF- $\alpha$  表达比较采用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 CNV 观察结果** 碱烧伤后第 1 天,各组可见角膜缘血管网扩张,未见新生血管芽生长,角膜上皮部分融解,基质层水肿均较重,瞳孔视不清。碱烧伤后第 3 天,各组均见新生血管芽由角膜缘向角膜中央区生长。空白组可见 CNV 生长密集,长而粗,呈毛刷状,已形成新生血管网,但未达角膜中央区,累及面积达到 1/2 ~ 1,角膜水肿明显,中央区上皮缺失;对照组与治疗组仅可见新生血管芽,短而细,生长稀疏,但对照组角膜上皮中央区缺失面积较大(图 1)。碱烧伤后第 7 天,空白组 CNV 生长达到高峰,密集粗乱,交织成网,角膜上皮已基本愈合;对照组与治疗组血管生长缓慢,稀疏,较细,治疗组角膜上皮已基本愈合,对照组部分角膜中央可见溃疡面(图 2)。碱烧伤后第 14 天,空白组新生血管已达角膜中央,粗大且密集;对照组可见周边小血管有退化趋势,仍有较多粗大血管,累及面积达 1/2 以上,部分角膜中央区变薄,2 例穿孔;治疗组周边细小血管已退化,其余血管短而稀疏,色淡(图 3)。

图1 大鼠角膜碱烧伤后第3天 CNV 照片。A、B、C 分别为空白组、对照组和治疗组

三组不同时间点 CNV 面积比较情况见表 1,碱烧伤后第 3 天、第 7 天和第 14 天,治疗组和对照组均小于空白组,差异均有显著统计学意义(均为  $P < 0.01$ );碱烧伤后第 3 天、第 7 天,治疗组与对照组差异均无统计学意义(均为  $P > 0.05$ );碱烧伤后第 14 天,治疗组明显小于对照组,差异具有显著统计学意义( $P < 0.01$ )。

**2.2 免疫组织化学染色检测 PEDF 蛋白表达** 碱烧伤后第 14 天,HE 常规染色结果显示,空白组见角膜上皮炎症细胞浸润(图 4A),伴有大量弥漫性血管增生,可见成熟的新生血管,血管腔内可见大量红细胞;对照组(图 4B)见部分角膜上皮缺失,肉芽组织

形成,上皮炎症细胞浸润,可见较多增生的血管,局灶区域血管密集,血管腔内见大量红细胞;治疗组(图 4C)见角膜上皮炎症细胞浸润,可见极少散在的增生血管,伴有纤维增生,上皮修复。免疫组织化学染色结果显示:治疗组 PEDF 蛋白表达于角膜上皮全层,细胞浆浓度明显增加,呈棕褐色,上皮见较多血管,血管内皮细胞染色加深,呈棕褐色;对照组 PEDF 蛋白在角膜上皮表达增多,呈棕黄色,细胞浆含量增加,内皮层及新生血管内皮细胞中也有表达;空白组 PEDF 蛋白在角膜上皮及血管内皮中有少量表达(图 5)。

图2 大鼠角膜碱烧伤后第7天 CNV 照片。A、B、C 分别为空白组、对照组和治疗组

图3 大鼠角膜碱烧伤后第14天 CNV 照片。A、B、C 分别为空白组、对照组和治疗组

表1 大鼠角膜碱烧伤后不同时间点3组 CNV 面积 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CNV 面积/ $\text{mm}^2$		
	第 3 天	第 7 天	第 14 天
空白组	9.49 $\pm$ 2.79	17.71 $\pm$ 4.06	25.35 $\pm$ 1.40
对照组	4.27 $\pm$ 2.68	6.44 $\pm$ 4.67	15.98 $\pm$ 4.75
治疗组	3.26 $\pm$ 1.82	8.59 $\pm$ 3.98	3.24 $\pm$ 2.34

**2.3 RT-PCR 检测角膜 PEDF mRNA 表达** RT-PCR 检测角膜组织中 PEDF mRNA 结果显示,碱烧伤后第 14 天,治疗组角膜组织中 PEDF mRNA 表达量为 0.68  $\pm$  0.18,对照组为 0.47  $\pm$  0.10,空白组为 0.22  $\pm$  0.47,治疗组明显高于对照组和空白组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.01$ )。

**2.4 酶联免疫吸附实验测定房水中 TNF- $\alpha$  表达** ELISA 法检测房水中 TNF- $\alpha$  蛋白含量结果显示,碱烧伤后第 14 天,治疗组房水中 TNF- $\alpha$  蛋白含量为 (24.09  $\pm$  6.02)  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,对照组为 (38.88  $\pm$  4.36)  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,空白组为 (58.55  $\pm$  13.25)  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,治疗组明显低于对照组与空白组,差异均有显著统计学意义(均为  $P < 0.01$ )。

图4 大鼠角膜碱烧伤第14天常规HE染色。A:空白组;B:对照组;C:治疗组

图5 大鼠角膜碱烧伤后第14天免疫组织化学染色检测PEDF蛋白表达。A:空白组;B:对照组;C:治疗组

### 3 讨论

碱烧伤诱导的CNV是许多细胞因子参与并相互作用的一个复杂过程<sup>[2]</sup>。一方面,体内高活性分子如活性氧自由基和活性氮自由基产生过多,氧化程度超出氧化物的清除,氧化系统和抗氧化系统失衡,使一系列促炎症因子、细胞因子和趋化因子的释放,导致CNV形成;另一方面,碱水解成羟自由基(OH·)和阳离子。羟基离子与组织内的脂肪结合,起皂化作用使组织软化,蛋白质溶解,碱性物质继续向深部扩散,穿透角膜基质进入眼内,导致一系列严重眼内改变。目前已经证实的主要因素包括<sup>[3]</sup>:血管内皮细胞生长因子、炎症因子、TNF- $\alpha$ 、基质金属蛋白酶(matrix-metalloproteinases, MMPs)、PEDF等。因此深入研究各因子之间的关系对CNV的预防和治疗有重要意义。

H<sub>2</sub>水具有抗炎<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>、抗凋亡<sup>[6]</sup>等作用<sup>[7]</sup>。其机制一方面与OH·和过氧亚硝基阴离子(ONOO·)反应发挥选择性抗氧化作用;另一方面通过调控炎症因子如白细胞介素和TNF- $\alpha$ 等起到抗炎作用。H<sub>2</sub>水还具有相对分子质量小、水溶性和脂溶性良好、可通过自由扩散穿透细胞膜到达线粒体等靶向细胞器的优势。Kubota等<sup>[8]</sup>通过制作大鼠碱烧伤诱导的CNV模型,发现H<sub>2</sub>水可以抑制NF- $\kappa$ B信号通

路,减少OH·生成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,抑制脂质过氧化。碱烧伤后立即用浓度为 $(0.5 \sim 0.6) \times 10^{-6}$  H<sub>2</sub>水灌洗眼球表面30 min,对照组使用PBS,结果表明,使用H<sub>2</sub>水的CNV面积和VEGF表达水平明显低于对照组。有学者<sup>[9]</sup>又发现,H<sub>2</sub>水可以预防白内障超声乳化手术诱导的氧化应激角膜内皮损伤。游玉霞等<sup>[10]</sup>研究发现H<sub>2</sub>水对缝线诱导的CNV有抑制作用。

本研究采用了碱烧伤诱导的CNV模型,与缝线诱导的CNV模型相比,其机制上复杂的化学因素与单纯的物理性刺激仍存在不同。本研究通过H<sub>2</sub>水滴眼,每次1滴(约10  $\mu$ L),每天4次,连续给药14 d。对照组选取妥布霉素地塞米松滴眼液,分别在碱烧伤后第1天、第3天、第7天和14天观察CNV生长面积,结果显示,治疗组和对照组在各时间点均较空白组明显减少,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$ );碱烧伤后第3天,治疗组CNV面积虽小于对照组,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );碱烧伤后第7天,治疗组CNV面积稍大于对照组,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。考虑为虽然H<sub>2</sub>水发挥了抑制CNV的作用,但与对照组相比,短期效果差异尚无统计学意义。在碱烧伤诱导的CNV初期,两种药物没有明显差异,但随着用药时间的延长,碱烧伤后第14天,治疗组CNV面积明显小于对照组,表现出良好的抑制作用,两组差异有显著统计学意义( $P <$

0.01)。并且本研究检测了角膜及房水中 PEDF mRNA 及 TNF- $\alpha$  蛋白表达,碱烧伤后第 14 天,治疗组角膜组织中 PEDF mRNA 含量明显高于对照组和空白组,差异均有显著统计学意义(均为  $P < 0.01$ )。治疗组房水中 TNF- $\alpha$  蛋白含量明显低于对照组与空白组,差异均有显著统计学意义(均为  $P < 0.01$ )。因此,H<sub>2</sub> 水滴眼对大鼠碱烧伤诱导的 CNV 具有抑制作用,可能通过调控炎症因子 TNF- $\alpha$ ,继而提高 PEDF 表达量,抑制新生血管,PEDF 是已知的最强的内源性血管抑制因子,具有高效性。且 PEDF 的抑制作用只针对新生血管,对健康的血管无害、安全。它在正常人眼组织中高表达,被认为是维持角膜、玻璃体无血管的关键因素<sup>[11]</sup>。Yamagishi 等<sup>[12]</sup> 研究发现 TNF- $\alpha$  能使细胞内活性氧自由基的产生明显增加,并诱导白细胞介素-6 的产生,进而下调能抑制内皮细胞生长和迁移的 PEDF mRNA 表达。

本研究中 H<sub>2</sub> 水浓度为  $1.6 \times 10^{-6}$ ,未见眼前节及全身毒性反应,但对照组在治疗过程中出现 2 例角膜穿孔。因此,H<sub>2</sub> 水在治疗碱烧伤诱导的 CNV 在烧伤后的炎症期与非炎症期均有一定抑制作用,且远期治疗效果较激素类明显增强。长期使用激素类药物可导致眼压升高、机会性感染,诱发后囊膜下白内障、角膜穿孔等。抗 VEGF 药物也是当前国内外治疗新生血管研究的热点。然而,此类药物只对症治疗而非病因治疗,且作用时间短,需反复多次注射,不仅增加了注射导致的并发症几率,也加重了患者经济负担。H<sub>2</sub> 水是自然元素,获取方便且价格低廉,对人体无明显毒副作用,本研究虽样本量较小,但对未来临床治疗 CNV 提供了一种崭新的策略。

参考文献

[1] TAO Y, GENG L, XU WW, QIN LM, PENG GH, HUANG YF.

The potential utilizations of hydrogen as a promising therapeutic strategy against ocular diseases [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2016, 12(7):799-806.

[2] CEJKA C, CEJKOVA J. Oxidative stress to the cornea, changes in corneal optical properties, and advances in treatment of corneal oxidative injuries [J]. *Oxidat Med Cellul Longev*, 2015, 2015:1-10.

[3] KRAWCZYK P, AMBROZIAK AM, SZAFLIK JP. Molecular aspects of corneal neovascularization [J]. *Klinika Oczna*, 2013, 116(3):210-214.

[4] GHARIB B, HANNA S, ABDALLAHI OM, LEPIDI H, GARDETTE B, REGGI MD. Anti-inflammatory properties of molecular hydrogen: investigation on parasite-induced liver inflammation [J]. *C R Acad Sci III*, 2001, 324(7):719-724.

[5] OHSAWA I, ISHIKAWA M, TAKAHASHI K, WATANABE M, NISHIMAKI K, YAMAGATA K. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals [J]. *Nat Med*, 2007, 13(7):688-694.

[6] CAI J, KANG Z, LIU WW, LUO X, QIANG S, ZHANG JH, et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 441(2):167-172.

[7] ZHANG JY, LIU C, ZHOU L, QU K, WANG R, TAI MH et al. A review of hydrogen as a new medical therapy [J]. *Hepatogastroenterology*, 2012, 59(116):1026-1032.

[8] KUBOTA M, SHIMMURA S, KUBOTA S, MIYASHITA H, KATO N, NODA K, et al. Hydrogen and N-acetyl-L-cysteine rescue oxidative stress-induced angiogenesis in a mouse corneal alkali-burn model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(1):427-433.

[9] IGARASHI T, OHSAWA I, KOBAYASHI M, IGARASHI T, SUZUKI H. Hydrogen prevents corneal endothelial damage in phacoemulsification cataract surgery [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:31190.

[10] YOU YX, LIANG QF, LI YJ, MA K. The preliminary study on the inhibiting effect of saturated hydrogen water on suture induced corneal neovascularization in rats [J]. *Ophthalmol CHN*, 2014, 23(5):335-338.  
游玉霞, 梁庆丰, 李玉洁, 马科. 饱和氢气水对大鼠角膜新生血管抑制作用的实验研究 [J]. 眼科, 2014, 23(5):335-338.

[11] ZHANG SX, MA JX. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2007, 26(1):1-37.

[12] YAMAGISHI SI, INAGAKI Y, NAKAMURA K, ABE R, SHIMIZU T, YOSHIMURA A, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF- $\alpha$ -induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation [J]. *J Mole Cellul Cardiol*, 2004, 37(2):497-506.