

负载曲安奈德水凝胶缓释片在兔眼微创小梁切除术中的抗瘢痕作用

何宇¹, 曾召君², 卢嵩杰², 刘俊巧², 范罕英¹, 荆琳¹, 王素贞¹, 姚曼¹, 舒静¹, 曾流芝¹

引用: 何宇, 曾召君, 卢嵩杰, 等. 负载曲安奈德水凝胶缓释片在兔眼微创小梁切除术中的抗瘢痕作用. 国际眼科杂志, 2024, 24(6): 848-856.

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目 (No.2021YFS0219)

作者单位: ¹(610041) 中国四川省成都市第一人民医院眼科;

²(610075) 中国四川省成都市, 成都中医药大学眼科学院

作者简介: 何宇, 毕业于四川大学华西医学院, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 青光眼、白内障、神经眼科。

通讯作者: 曾流芝, 硕士研究生导师, 主任医师, 眼科主任, 研究方向: 青光眼. 676681961@qq.com

收稿日期: 2024-01-09 修回日期: 2024-04-29

摘要

目的: 研究负载曲安奈德(TA)的水凝胶缓释片在兔眼“单步隧道法”新型微创小梁切除术(SIGS)中的抗瘢痕作用及其安全性。

方法: 选择健康新西兰大耳白兔48只, 随机分为四组(每组12只), 小梁切除术组(Trab组)、SIGS组、在SIGS术中结膜瓣下植入聚乙烯醇水凝胶(PVAH)薄片(PVAH组)、在SIGS术中结膜瓣下植入负载TA的水凝胶缓释片(TA/PVAH组)。分别于术后1、2、3、4 wk观察并记录各组眼压、滤过泡形态、前房反应及其它并发症情况, 并处死动物, 取右眼术区组织行病理组织石蜡切片, 并行Masson染色、苦味酸-天狼星玫瑰红染色及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、纤维细胞生长因子-2(FGF2)免疫组化染色。观察局部组织炎性细胞浸润情况、成纤维细胞增殖及I型、III型胶原纤维合成情况, 计算并比较各组 α -SMA、FGF2抗体免疫组化染色的平均阳性面积比。

结果: 术后2 wk TA/PVAH组均保持了弥散隆起的功能性滤过泡, 而Trab组、SIGS组和PVAH组均有术眼出现扁平滤过泡。术后4 wk, PVAH组、TA/PVAH组分别有1眼(33%)、2眼(67%)存在功能性滤过泡, 其余滤过泡均扁平。Masson染色显示: 术后4 wk PVAH组和TA/PVAH组水凝胶均未降解, 相对于Trab组和SIGS组, 滤过道更为明显, 有较少胶原纤维增生。天狼星玫瑰红染色显示: 术后4 wk, 与Trab组、SIGS组和PVAH组相比, TA/PVAH组的I型胶原和III型胶原的表达更少。免疫组化染色显示: 术后1 wk, TA/PVAH组 α -SMA表达较Trab组和SIGS组均明显降低($P<0.01$); 术后2 wk Trab组和SIGS组 α -SMA表达最高, 而PHAP组和TA/PVAH组结膜组织中 α -SMA表达较前两组均显著降低($P<0.01$)。与Trab组相比, PVAH组、TA/PVAH组术后1、2、3、4 wk FGF2表达均明显升高($P<0.05$); 与SIGS组相比, TA/PVAH组术后4 wk FGF2表达明显升高($P<0.05$)。

结论: 兔眼SIGS术中联合结膜瓣下填充负载TA的水凝胶缓释片能有效抑制手术区滤过道瘢痕化, 可能是TA抗瘢痕作用与水凝胶支架作用的共同结果。

关键词: 微创小梁切除术; 曲安奈德; 水凝胶; 抗瘢痕

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.6.03

Anti-scarring effects of triamcinolone acetonide-loaded hydrogel sustained-release sheeting on stab incision glaucoma surgery in rabbit

He Yu¹, Zeng Zhaojun², Lu Songjie², Liu Junqiao², Fan Hanying¹, Jing Lin¹, Wang Suzhen¹, Yao Man¹, Shu Jing¹, Zeng Liuzhi¹

Foundation item: Major Research and Development Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (No. 2021YFS0219)

¹Department of Ophthalmology, Chengdu First People's Hospital, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ²Eye School of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Correspondence to: Zeng Liuzhi. Department of Ophthalmology, Chengdu First People's Hospital, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. 676681961@qq.com

Received: 2024-01-09 Accepted: 2024-04-29

Abstract

• AIM: To observe the anti-scarring effects and safety of triamcinolone acetonide (TA)-loaded hydrogel sustained-release sheeting on stab incision glaucoma surgery (SIGS) with “one-step tunnel method” in rabbit eyes.

• METHODS: A total of 48 healthy New Zealand white rabbits were randomly selected and divided into 4 groups (12 rabbits in each group), trabeculectomy (Trab) group, SIGS group, polyvinyl alcohol hydrogel (PVAH) sheeting was implanted under the conjunctiva flap during SIGS (PVAH group), and hydrogel sustained-release sheeting loaded with TA was implanted under the conjunctiva flap during SIGS (TA/PVAH group). On the 1, 2, 3, and 4 wk after surgery, the intraocular pressure, filtering bubble morphology, anterior chamber reaction, and other complications were observed and recorded in each group. Then animals were euthanized, and the surgery area tissues of right eye were taken for

pathological tissue paraffin section. Masson staining, picric acid-Sirius rose red staining, as well as α -smooth muscle actin (α -SMA) and fibroblast growth factor 2 (FGF2) immunohistochemistry staining was performed on every section. The infiltration of inflammatory cells, proliferation of fibroblasts and synthesis of type I and type III collagen fibers in local tissues were observed. The average positive area ratio of α -SMA and FGF2 antibody immunohistochemical staining in each group was calculated and compared.

• **RESULTS:** The TA/PVAH group maintained diffuse and elevated functional filtering blebs, while flat filtering blebs appeared in Trab, SIGS and PVAH groups at 2 wk after surgery. Functional filtering blebs were present in 1 eye (33%), 2 eyes (67%) in the PVAH and TA/PVAH group at 4 wk after surgery, respectively, while the other filtering blebs were flattened. Masson staining showed that the hydrogels in PVAH and TA/PVAH groups did not degrade at 4 wk after surgery. Compared with the Trab and SIGS groups, the filtration passages were more obvious, with less collagen fiber proliferation. Sirius red staining showed that the expression of type I collagen and type III collagen in the TA/PVAH group was less than that in the Trab group, SIGS group and PVAH group at 4 wk after surgery. Immunohistochemical staining showed that the α -SMA expression in the TA/PVAH group was significantly lower than that in the Trab and SIGS groups at 1 wk after surgery ($P < 0.01$). The α -SMA expression was the highest in the Trab and SIGS groups at 2 wk after surgery, while the α -SMA expression in the PHAP and TA/PVAH groups was significantly lower than that in the first two groups ($P < 0.01$). Compared with the Trab group, the expression of FGF2 in the PVAH and TA/PVAH group was significantly increased at 1, 2, 3 and 4 wk after surgery ($P < 0.05$). Compared with the SIGS group, FGF2 expression in the TA/PVAH group was significantly increased at 4 wk after surgery ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** In SIGS surgery of rabbit eyes, implanting hydrogel sustained-release sheeting loaded with TA under conjunctival flap can effectively inhibit the scarring of the filtering bleb, which may be the interaction of the anti-scar effect of TA and the stent function of hydrogel.

• **KEYWORDS:** minimally invasive trabeculectomy; triamcinolone acetonide; hydrogel; anti-scarring

Citation: He Y, Zeng ZJ, Lu SJ, et al. Anti-scarring effects of triamcinolone acetonide-loaded hydrogel sustained-release sheeting on stab incision glaucoma surgery in rabbit. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(6):848-856.

0 引言

青光眼是目前全球第一大不可逆致盲性眼病,控制眼压是青光眼治疗的主要策略。青光眼滤过性手术(glaucoma filtration surgery, GFS)以小梁切除术为代表,后者是经典的抗青光眼手术方式,但常由于滤过泡内成纤维细胞增殖和胶原产生,致使滤过道瘢痕化而导致手术失败。有资料显示 GFS 术后 2 a 内出现眼压再次升高的比

例达到 15%–30%^[1]。结膜瓣的制作是 GFS 中重要的一步,减少术中结膜的操作可能会减少结膜下纤维化,并长期改善房水引流。因此如何改进 GFS 并减少术后滤过泡瘢痕化一直是临床研究的热点。比如单一使用药物减缓结膜瘢痕化、改变手术入路以及切除部位的位置或大小等,虽然对提高 GFS 的成功率起到了一定积极的作用,但总体改善程度仍然有限。穿刺切口青光眼手术(stab incision glaucoma surgery, SIGS)是一种“单步隧道法”的小梁切除术(文中统称为“微创小梁切除术”),它是 2014 年由 Jacob 和 Agarwal 首次提出的一种改良的小梁切除术,该手术在减少结膜操作的基础上试图通过更好的房水引流减少结膜下纤维化^[2-3]。

此外,诸多抗瘢痕药物被应用于 GFS 的临床与实验研究中,常用的有丝裂霉素、环孢素、5-氟尿嘧啶等,但均可能对眼表甚至眼内组织造成毒副作用。曲安奈德(triamcinolone acetonide, TA)作为一种中效糖皮质激素,具有起效快、疗效高和持效久的特点,具有抗炎、抗瘢痕化作用,广泛应用于临床。有研究表明,其药物有效期恰好在青光眼术后炎症反应及瘢痕形成关键期内,能抑制新生血管及成纤维组织增生,降低术后滤过泡瘢痕化形成,从而提高手术成功率^[4]。聚乙烯醇水凝胶(polyvinyl alcohol hydrogel, PVAH)作为载体具有良好的生物相容性,且具备多微孔结构,可按一定比例材料混合的方式负载 TA。本文在兔眼的 SIGS 手术中联合应用了一种负载 TA 的 PVAH 薄层缓释片作为结膜瓣下的填充物,以期达到减轻术后滤过泡瘢痕化的作用,本文将探究其抗滤过泡瘢痕化的作用机制以及其安全性和有效性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **实验动物** 随机选取健康无眼病的新西兰大耳白兔 48 只,3–4 月龄,体质量 2.0–2.5 kg,雄性。术前用裂隙灯显微镜检查排除眼前段炎症性病变,用回弹式眼压(TonoVet, iCare, 芬兰)计测量眼压,以确定实验动物的基础眼压,手术实验平台由四川省人民医院动物实验中心提供。所有实验动物的喂养和使用均遵循四川省人民动物实验中心伦理规定。

1.1.2 **实验试剂及材料** (1)负载 TA 的 PVAH 缓释片的制备:通过反复冷冻—融化法制备 PVAH。PVA 按照 0588 : 1799 = 2 : 8 (0588 1.0g, 1799 4.0g) 掺配比例进行混合,PVA 与纯水比值为 1 : 10 (PVA 总质量 5 g, 纯水 50 mL) 混合后置于磁力搅拌器上加热搅拌至完全溶解。冷却至室温并消泡,注入 6 mL TA 注射液并搅拌均匀后倒入培养皿中成型。然后放入 -20 °C 冰箱冷冻 24 h,解冻温度为 18 °C 以上,解冻 8 h。重复以上冷冻解冻过程 7 次,即制得负载 TA 的 PVAH (以上由四川大学物理学院提供)。水凝胶具备多微孔结构,层厚不超过 0.5 mm,使用时在无菌条件下用 5 mm 直径的环钻将其切割成相应尺寸,满足 SIGS 手术部位的尺寸要求。(2)采用激光扫描电子显微镜(JIB-4700F 场发射扫描电镜,日本电子)进行结构表征分析:将洗涤干净的 PVAH 薄片和 TA/PVAH 缓释片,放入烘箱中进行干燥除水,然后在其表面喷金,用扫描电镜在 15 kV 加速电压下观察其表面形态(图 1、2)。(3)PVAH 和 TA/PVAH 缓释片生物相容性检测:通过 MTT 法体外细胞毒性试验验证 PVAH 和 TA/PVAH 缓释片的生物相容性,以 L-929 细胞作为培养材料采用 MTT [3–

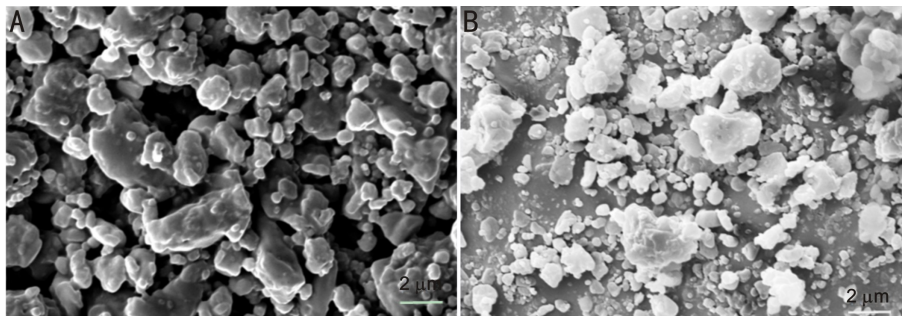


图1 激光扫描电子显微镜下PVAH薄片和TA/PVAH缓释片的表面结构 A:PVAH薄片;B:TA/PVAH缓释片。

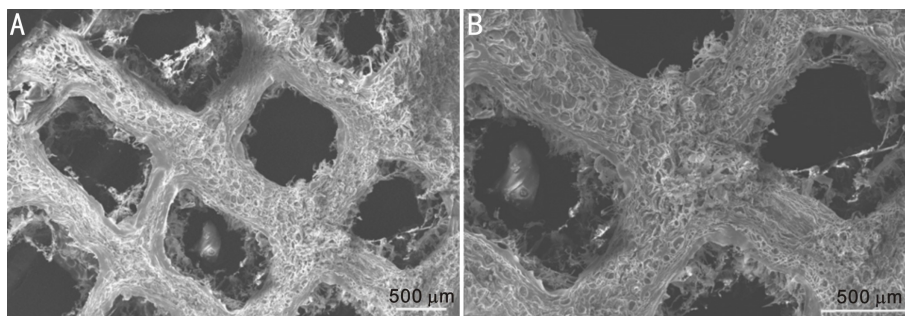


图2 激光扫描电子显微镜下PVAH薄片的多微孔结构 A:放大30倍;B:放大50倍。

(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]直接接触培养的方式,接种L-929细胞悬液到96孔板中,置于培养箱中培养(5% CO₂, 37℃)24 h,分别加入不同浓度的试验样品提浸液(100%、75%、50%、25%),继续在原有条件下培养24 h,行细胞形态学观察,然后每孔加50 μL MTT(1 mg/mL),培养2 h后测定吸光度值。(4)PVAH体外降解率试验:将配制好的PVAH缓释片用少量纯化水冲洗滤出物,将缓释片干燥至恒重。用PBS(pH 7.2)进行浸泡,淹没样块。每7 d取出样品洗干表面,干燥后称重并拍照。采用新的PBS继续降解,降解度采用如下公式计算:降解度(%)=(D1-D2)/D1×100%(D1:降解之前聚合物的重量;D2:降解特定时间的聚合物重量)。平行测定三组样品,取平均值。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 48只动物随机平均分为4组(每组12只):Trab组(小梁切除术)、SIGS组、PVAH组(在SIGS术中结膜瓣下植入PVAH薄片)、TA/PVAH组(SIGS术中结膜瓣下植入负载TA的PVAH薄片)。

1.2.2 手术方法 实验兔肌肉注射舒泰(Zoletil注射液)进行全身麻醉,注射量为50-75 mg/kg,用眼压计测量实验兔的眼压。选取右眼为实验眼,盐酸奥布卡因滴眼液点眼表面麻醉,0.5%碘伏消毒眼周及结膜囊,颞上方结膜下注射利多卡因0.1 mL局部浸润麻醉。手术方式:Trab组:在颞上做以穹窿部为基底的结膜瓣,做以角膜缘为基底的巩膜瓣(3 mm×3 mm),厚度为1/3-1/2巩膜厚度,分离至透明角膜内0.5 mm处。在巩膜瓣基底处切除角膜缘近小梁组织1.5 mm×1 mm,并做虹膜周边切除,10/0尼龙线间断缝合巩膜瓣两针,并间断缝合结膜瓣,检查滤过泡无渗漏。SIGS组:(1)选择颞上为手术区域,弯平镊夹住颞上方球结膜并向前推向角膜缘,使用1.8 mm角膜穿刺刀从角膜缘后1.5 mm处经结膜潜行进入板层巩膜,形成板层巩膜隧道;(2)角膜刀进入透明角膜约0.5 mm后平行虹膜进

入前房;(3)前房内注入少量黏弹剂,利用0.75 mm巩膜咬切器经巩膜隧道咬切角膜内唇2次,咬切小梁组织约1.5 mm×1 mm;(4)经巩膜隧道行周边虹膜切除术;(5)使用平衡盐溶液冲洗前房内黏弹剂,形成前房,10/0尼龙线缝合巩膜切口一针,检查隧道口无明显渗漏,10-0尼龙线间断缝合球结膜切口,检查滤过泡无渗漏。PVAH组、TA/PVAH组:于SIGS组第(5)步缝合巩膜瓣后,在巩膜瓣表面平铺PVAH薄片或TA/PVAH缓释片,再间断缝合结膜瓣,检查滤过泡有无渗漏。术后各组术眼均点用妥布霉素地塞米松滴眼液每日3次、左氧氟沙星眼用凝胶每日1次抗炎预防感染。

1.2.3 观察指标 (1)裂隙灯观察:1)眼前节反应情况:观察结膜的充血情况,角膜是否水肿,前房深度及是否有出血和炎性反应、晶状体透明度;2)观察滤过泡在不同时间点的形态,并照相记录,参照Moorfield分型法:I、II型为功能性滤过泡,III、IV型为非功能性滤过泡;按照Moorfield滤过泡分级,将术后滤过泡的转归分为4种:I型(功能性滤过泡):壁薄、灰白色、局限的滤过泡,结膜下有疏松伴囊腔的组织形成;II型(功能性滤过泡):壁薄、灰白色、范围广弥散的滤过泡,结膜下有疏松伴囊腔的组织形成;III型(扁平滤过泡):壁厚、显著充血、粗大新生血管长入、结膜下有致密的组织形成;IV型(包裹性囊状泡):局限、圆顶状隆起、结膜下形成巨大囊腔,其内充满液体。(2)眼压监测:分别于术后1、2、3、4 wk采用回弹式眼压计测眼压,观察眼压是否异常。

1.2.4 病理组织学检查以及免疫组化染色 (1)组织标本的制备:于术后1、2、3、4 wk分别麻醉并处死各组实验兔3只,立即在显微镜下以滤过道区域为中心,自角膜缘向后剪取约8 mm×8 mm大小的眼球壁全层组织(包含结膜、结膜下组织、巩膜及色素膜组织),放入FAS眼球固定液中固定24 h,然后制作石蜡切片备用。(2)Masson三色染色:石蜡切片常规脱蜡,蒸馏水冲洗数分钟,苏木素染色

8 min,流水冲洗。盐酸乙醇分化,流水蓝化,蒸馏水洗。丽春红酸性品红液染色 10 min,蒸馏水冲洗。质量分数 1%磷钼酸中染色 5 min,苯胺蓝溶液复染 5 min。流水快速冲洗,置 60 °C 烘箱烘干,无水乙醇脱水 2 次,二甲苯透明,中性树胶封固。观察滤过道新生胶原纤维的增殖情况。(3)苦味酸-天狼星玫瑰红染色:石蜡切片脱蜡至水,放入天狼星红复合染液 5-10 min,无水乙醇漂洗;梯度酒精脱水;二甲苯透明中性树胶封固。染色结果判定:阳性表达:偏振光下 I 型胶原为亮黄色或红色,III 型胶原为绿色。观察滤过道 I 型、III 型胶原纤维的增殖情况。(4)免疫组化染色:按照免疫组化染色试剂盒说明进行染色。使用显微摄像系统(数码三目显微摄像系统,BA400Digital)对切片进行图像采集,每眼选取 3 张切片,每张切片先于低倍下观察全部组织。再于术区组织处随机选择 3 个视野采集 200 倍显微图像,使用 Halo 数据分析系统(National Institutes of Health,Image-J)计算每张图像阳性面积占比(% DAB Positive Tissue),判断标准为细胞核内出现棕黄色颗粒沉着者,取平均值作为该切片的阳性细胞数,分析兔眼滤过通道术后不同时间点 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、纤维细胞生长因子-2(Fibroblast growth factor, FGF2)的表达量。

统计学分析:应用 SPSS 25.0 统计分析软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,同一时间点多组间比较采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PVAH 和 TA/PVAH 缓释片理化性能及生物相容性评价结果

2.1.1 体外细胞毒性试验结果 PVAH 和 TA/PVAH 缓释片浸提液对 L-929 细胞均未显示潜在的细胞毒性。

2.1.2 PVAH 体外降解率试验 体外试验前 3 d PVAH 开始快速溶解且变得不透明,其溶解率随着时间的增加而增加,但即使当溶解时间足够长时,水凝胶也不会完全降解(图 3)。归其原因,应该是其中某些参与形成交联网络的高分子链未被溶解,它的解体需要吸收较大的能量,因此部分结构仍能保持。

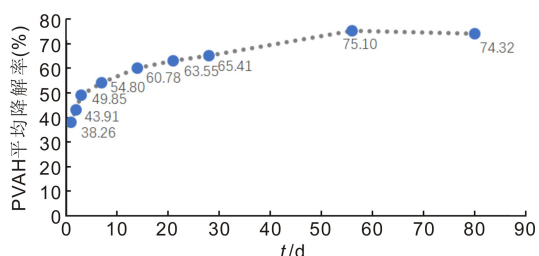


图 3 PVAH 降解率曲线。

2.2 并发症情况 术中前房积血 7 眼(Trab 组 3 眼、SIGS 组 2 眼、PVAH 组和 TA/PVAH 组各 1 眼),均于术后 1 wk 内自行吸收;术后低眼压、浅前房 3 眼(Trab 组 2 眼、SIGS 组 1 眼);绝大多数术眼在术后 1-2 d 有轻微的前房炎症反应,表现为 Tyn 阳性、浮游细胞阳性,1 wk 内均可消退,除 Trab 组 1 眼于术后 1 wk 出现滤过泡感染及前房积脓,予剔出试验,并增补一只实验兔入 Trab 组,Trab 组眼数不变。其余均无前房渗出等严重的眼内炎症;角膜水肿 8 眼(Trab 组 4 眼、SIGS 组 2 眼、PVAH 组和 TA/PVAH 组各 1 眼),用药后 1 wk 内完全恢复。各组均无其它严重并发症发生。

2.3 滤过泡情况 裂隙灯下观察,术后 1 wk 各组均为轻微隆起弥散的 II 型滤过泡,充血较为明显;术后 2 wk,Trab 组、SIGS 组、PVAH 组各有 4、3、2 眼滤过泡扁平(III 型),而 TA/PVAH 组均可见弥散隆起的 II 型滤过泡。术后 4 wk, PVAH 组和 TA/PVAH 组各有 1 眼和 2 眼滤过泡弥散隆起(II 型),其余滤过泡均扁平,见表 1,图 4。

2.4 组织病理学检查

2.4.1 Masson 染色结果 胶原纤维呈蓝色,肌纤维、细胞质和红细胞呈红色,细胞核呈蓝褐色。PVAH 及 TA/PVAH 缓释片至术后 4 wk 均未降解,其周围可见滤过道间隙。与其它组相比,TA/PVAH 组术后滤过泡区结膜组织较为疏松,胶原纤维增生更少,缓释片周围有较大的液性腔隙(图 5)。

2.4.2 天狼星红染色结果 观察术后不同时间点滤过道 I 型、III 型胶原纤维的增殖情况,偏振光下 I 型胶原为亮黄色或红色,III 型胶原为绿色。可见各组滤过泡区均有 I 型胶原及 III 型胶原增生,与其它各组相比,TA/PVAH 组滤过泡区 I 型和 III 型胶原增生较少(图 6)。

2.4.3 免疫组化结果 滤过泡区结膜组织 α -SMA 表达情况:术后 1 wk,与 SIGS 组相比,PHAP 组结膜组织中 α -SMA 表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);而 TA/PVAH 组结膜组织中 α -SMA 表达较另外三组均明显降低,差异有显著统计学意义(均 $P<0.01$)。术后 2 wk, Trab 组和 SIGS 组 α -SMA 表达最高,而 PHAP 组和 TA/PVAH 组 α -SMA 表达较 Trab 和 SIGS 组均显著降低,其中,TA/PVAH 组 α -SMA 表达较 PHAP 组显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),术后 3、4 wk 各组 α -SMA 表达无明显统计学意义($P>0.05$),见表 2。术后 4 wk 各组滤过泡区 α -SMA 免疫组化表达情况见图 7。

滤过泡区结膜组织 FGF2 表达情况:与 Trab 组相比, PVAH 组术后 1、2、3 wk FGF2 表达均明显升高,差异有统计学意义(均 $P<0.05$);与 Trab 组相比,TA/PVAH 组术后 1、2、3、4 wk FGF2 表达均明显升高,差异有统计学意义

表 1 各组术后 4 wk 功能性滤过泡分布情况

组别	术后 1 wk (n=12)	术后 2 wk (n=9)	术后 3 wk (n=6)	术后 4 wk (n=3)
Trab 组	12(100)	5(56)	1(17)	0
SIGS 组	12(100)	6(67)	2(33)	0
PVAH 组	12(100)	7(78)	3(50)	1(33)
TA/PVAH 组	12(100)	9(100)	5(83)	2(67)

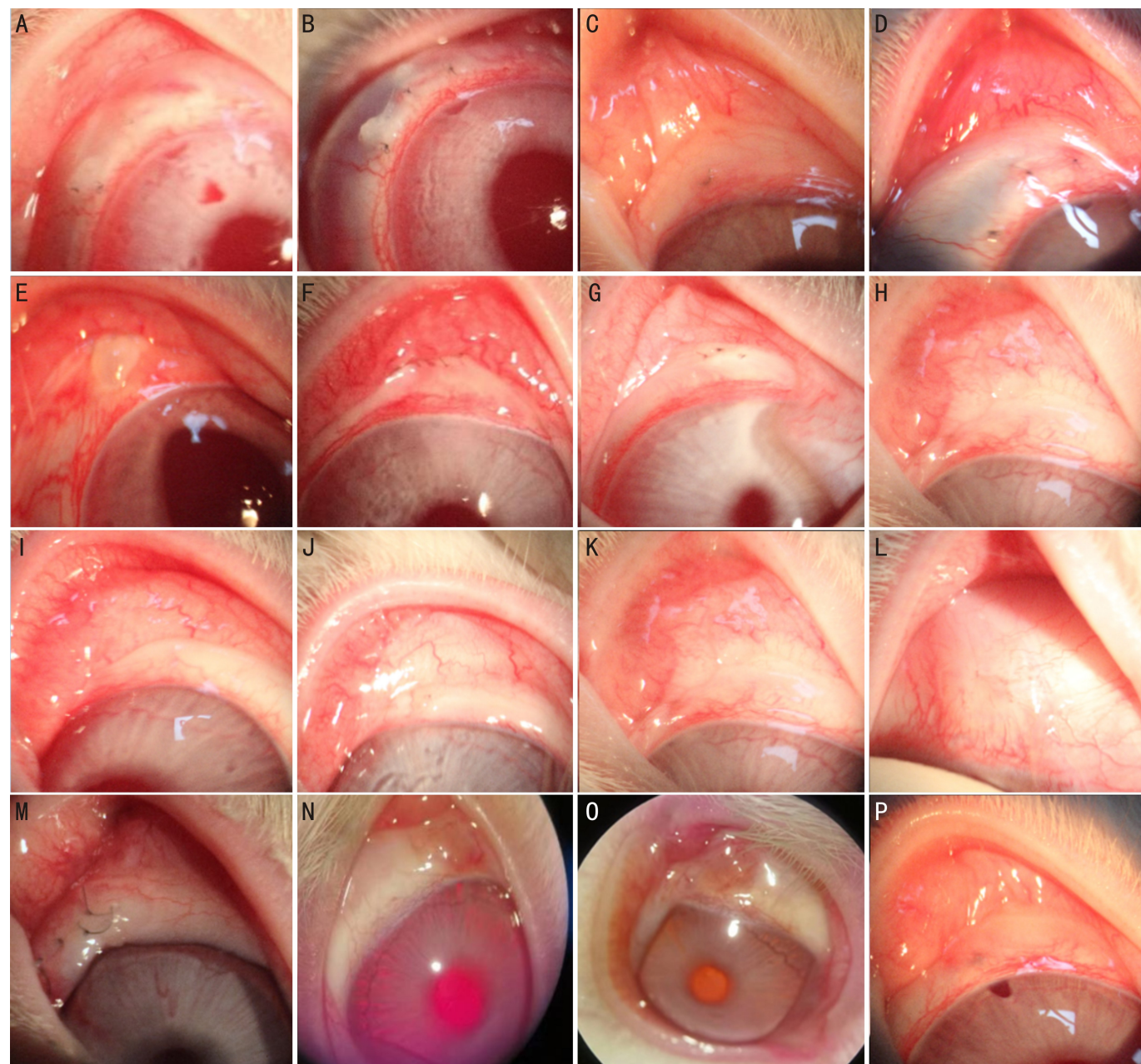


图4 四组术后1-4 wk滤过泡形态 A-D:Trab术后滤过泡形态,术后1-2 wk滤过泡弥散隆起,术后3 wk滤过泡较低平,术后4 wk滤过泡基本消失,表面及周围血管增生明显;E-H:SIGS术后滤过泡形态,术后1 wk滤过泡局部隆起,囊样改变,术后2-3 wk滤过泡弥散低平,术后4 wk滤泡基本消失;I-L:PVAH组术后滤过泡形态,术后1-2 wk滤过泡弥散隆起,术后3 wk滤过泡弥散低平,血管增生,术后4 wk滤过泡扁平,可见纤维血管增生,瘢痕形成;M-P:TA/PVAH组术后滤过泡形态,术后1 wk滤过泡弥散隆起,充血较明显,术后2-3 wk充血减轻,滤过泡均弥散隆起,术后4 wk仍可见均匀弥散的滤过泡。

(均 $P < 0.05$);与 SIGS 组相比,TA/PVAH 组术后 3、4 wk FGF2 表达明显升高,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 3,图 8。

3 讨论

随着青光眼手术的不断改进和创新,微创青光眼手术已在一定程度上取代了传统小梁切除术,但由于后者公认的降眼压效果和不同地区技术发展的差异,目前小梁切除术仍在抗青光眼手术中占有重要的地位。而由于滤过道瘢痕化等原因,小梁切除术的远期失败率高达 15% - 30%,因此该类手术的应用和改进一直是临床研究的热点。术中结膜组织血管的破坏和渗出物对成纤维细胞的刺激作用是术后滤过泡瘢痕化的重要原因^[5]。而减少术

中对结膜和 Tenon 囊的过度操作可预防纤维化的发生。本研究中采用一种改良的小梁切除术,即 SIGS,该手术利用穿刺切口法制作隧道式巩膜瓣是其操作上与传统小梁切除术最主要的区别^[2-3]。团队前期研究对 SIGS 治疗成人青光眼(70 眼)6 mo 疗效观察显示:47% 的患者眼压完全控制,40% 使用 2 种及以下的降眼压药物后眼压 ≤ 21 mmHg,手术总成功率为 87%,其中 POAG 患者手术完全成功率为 56%,总成功率 83%,且未出现严重的术后并发症^[6]。同时我们也发现:由于没有对结膜和 Tenon 囊进行过多的分离,SIGS 术后更容易形成较为局限的功能性滤过泡和扁平滤过泡,这对长期滤过功能的维持是不利的。为进一步减少 SIGS 术后组织纤维化及瘢痕的不利

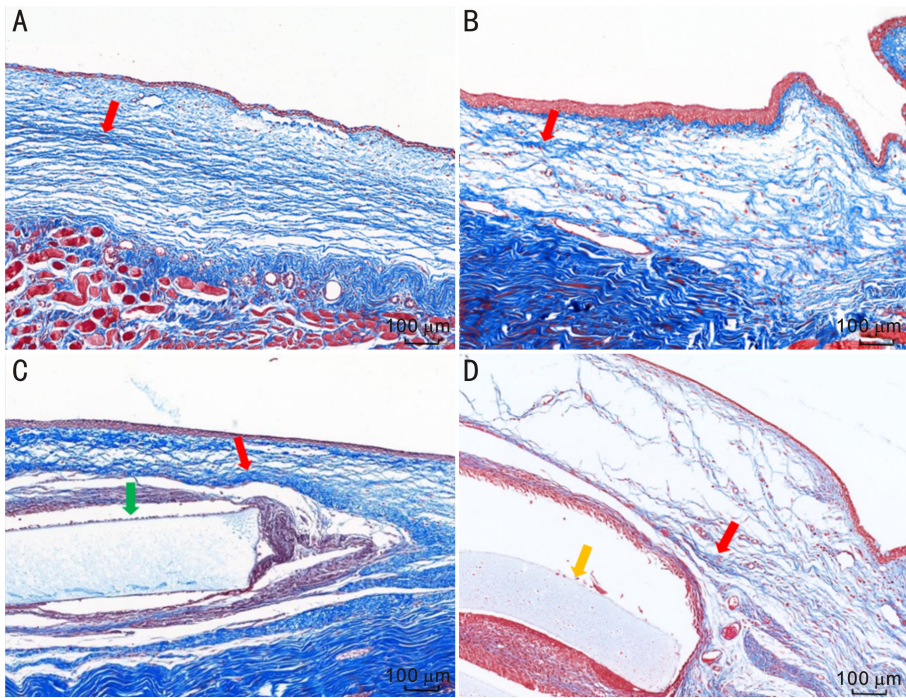


图5 术后4 wk 各组兔眼滤过泡区组织病理学表现 (Masson 染色) A:Trab 组滤过道间隙小,基本消失,可见明显胶原纤维增生(红箭头);B:SIGS 组滤过泡疏松,其间可见胶原纤维增生(红箭头);C:PVAH 组水凝胶尚未降解(绿箭头),其周围可见滤过道间隙,伴有炎性细胞聚集,结膜区可见胶原纤维增生(红箭头);D:TA/PVAH 组 TA/PVAH 缓释片尚未降解(黄箭头),缓释片周围可见较大的液性腔隙,其周围可见炎性细胞,滤过泡区结膜组织较疏松,可见少许胶原纤维增生(红箭头)。

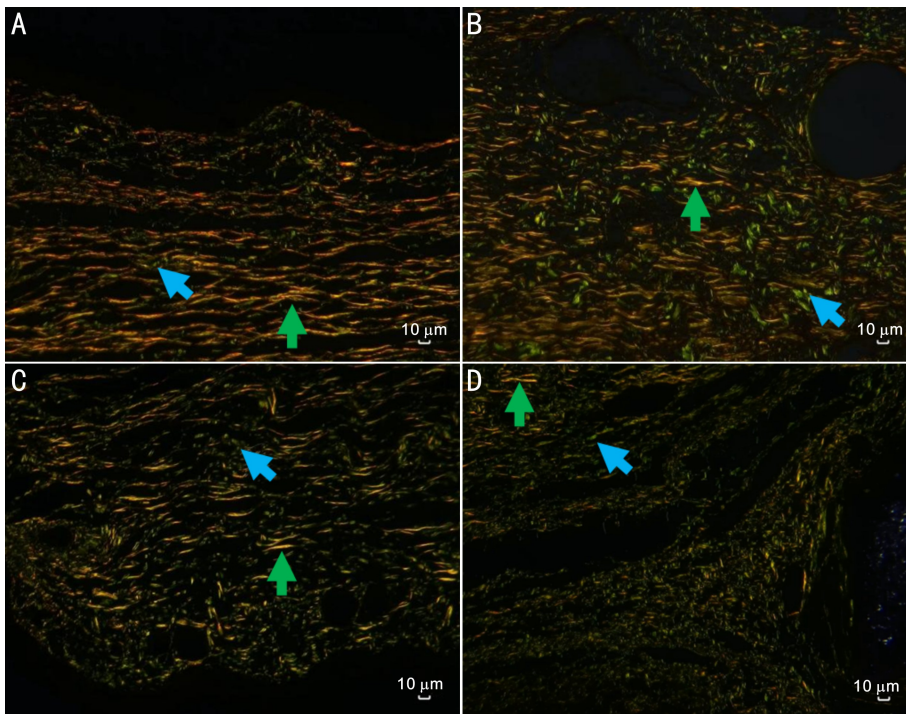


图6 术后4 wk 各组滤过泡区 I 型和 III 型胶原表达情况 (天狼星 I 染色) A:Trab 组滤过泡区 I 型胶原(绿箭头)及 III 型胶原(蓝箭头)均有明显增生,以 III 型为主;B:SIGS 组滤过泡区 I 型胶原(绿箭头)及 III 型胶原(蓝箭头)均有增生;C:PVAH 组滤过泡区 I 型胶原(绿箭头)及 III 型胶原(蓝箭头)均有增生;D:TA/PVAH 组滤过泡区可见少量 I 型胶原(绿箭头)及 III 型胶原(蓝箭头)增生。

影响,本实验制备了 TA/PVAH 缓释片,将其在兔眼 SIGS 术中置于巩膜瓣与结膜瓣之间。由于水凝胶具有可降解、多微孔的材料特性,可起到支撑结膜瓣,防止结膜下 Tenon 囊与巩膜组织粘连的作用,且不影响房水自巩膜隧道切口向外引流,可在术后早期维持滤过道的外引流空间。负载 TA 的药物成分,可增强缓释片在切口局部的抗

炎及抗纤维增生的特性,进一步加强其术后抗滤过泡瘢痕化的效果。

青光眼滤过术后伤口的愈合是一个复杂的病理生理过程,术后血-房水屏障的破坏和手术区的炎症反应使成纤维细胞增殖、产生大量的细胞因子,刺激炎症细胞局部趋化,滤过区成纤维细胞移行、增殖,新生血管形成及细胞

表2 各组术后各时间点 α -SMA 表达情况

组别	术后 1 wk	术后 2 wk	术后 3 wk	术后 4 wk
Trab 组	19.115±11.124	23.330±1.601	10.389±3.381	10.125±1.666
SIGS 组	20.552±2.354	25.193±0.098	16.149±6.440	11.429±2.519
PVAH 组	13.368±2.323 ^c	12.741±2.656 ^{b,d}	13.502±9.961	14.276±2.149
TA/PVAH 组	4.109±1.502 ^{b,d,f}	8.521±3.608 ^{b,d,f}	8.874±3.997	8.087±6.519
<i>F</i>	10.298	34.691	0.752	1.434
<i>P</i>	0.004	<0.001	0.551	0.303

注:^b*P*<0.01 vs 同时间点 Trab 组;^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 同时间点 SIGS 组;^f*P*<0.01 vs 同时间点 PVAH 组。

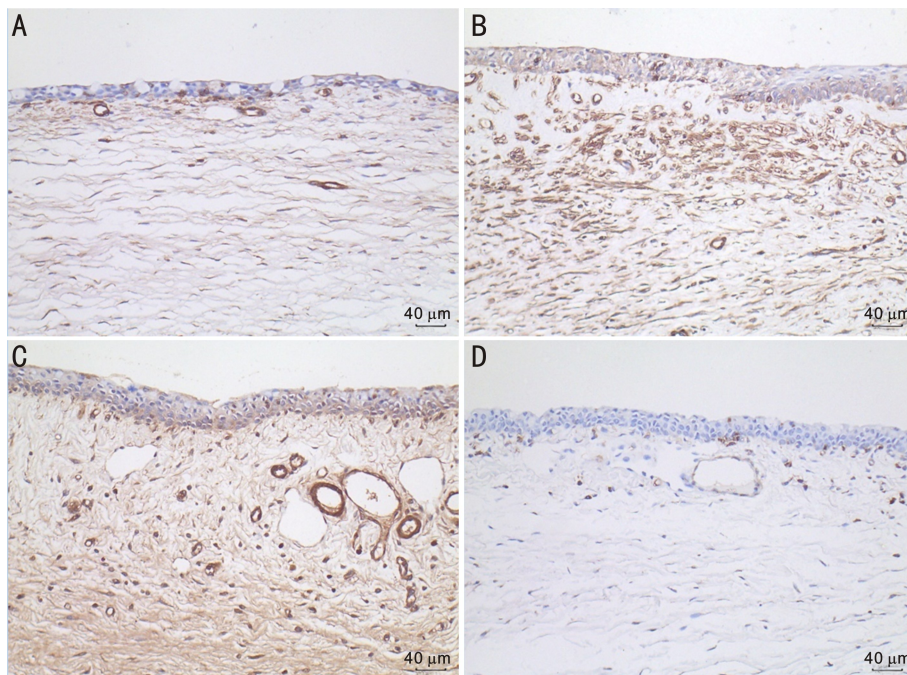


图7 术后4 wk 各组滤过泡区 α -SMA 免疫组化表达情况 A:Trab 组;B:SIGS 组;C:PVAH;D:TA/PVAH 组。

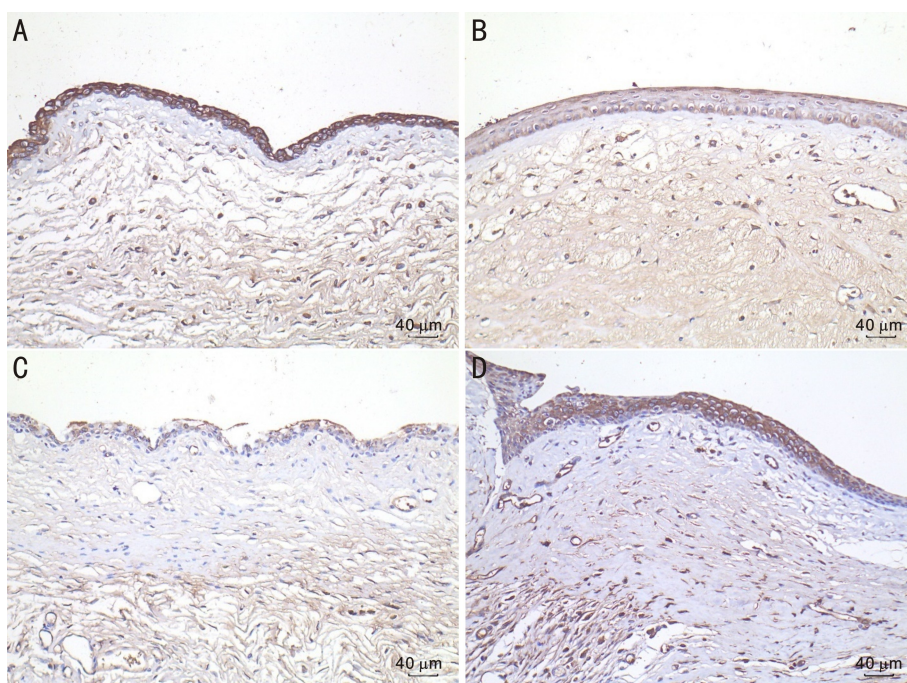


图8 术后4 wk 各组滤过泡区 FGF2 免疫组化表达情况 A:Trab 组;B:SIGS 组;C:PVAH 组;D:TA/PVAH 组。

外基质的合成与收缩,致使胶原合成增多,瘢痕化形成^[5]。其中转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β) 在瘢痕的形成过程中有关键调控的作用,被认为是与结膜

瘢痕化最相关的亚型^[7]。FGF2 可以通过抑制 TGF- β 1 介导的成纤维细胞激活,从而降低瘢痕组织中 α -SMA、钙调蛋白、结缔组织生长因子、ED-A 纤维连接蛋白、I 型胶原

表3 术后各时间点 FGF2 表达情况

$\bar{x} \pm s$

组别	术后 1 wk	术后 2 wk	术后 3 wk	术后 4 wk
Trab 组	9.621±4.915	8.534±1.521	8.998±0.484	7.280±3.831
SIGS 组	12.912±3.265	10.453±2.674	8.046±1.122	8.484±0.545
PVAH 组	13.398±2.446 ^a	12.422±1.731 ^a	13.256±2.330 ^{a,c}	10.661±5.524
TA/PVAH 组	15.558±0.938 ^a	13.029±5.443 ^a	13.180±4.870 ^{a,c}	12.855±1.307 ^{a,c}
<i>F</i>	1.733	1.186	2.939	1.539
<i>P</i>	0.237	0.375	0.099	0.278

注:^a*P*<0.05 vs 同时间点 Trab 组;^c*P*<0.05 vs 同时间点 SIGS 组。

纤维的增高,最终达到抗纤维化的作用^[8]。 α -SMA 是肌成纤维细胞特征性表达的细胞骨架蛋白,也是成纤维细胞活化转化为肌成纤维细胞的标志,在组织纤维化、伤口愈合、瘢痕形成中起着重要的作用^[9]。本文选择 α -SMA 和 FGF2 作为免疫组化观察指标,以进一步探讨 TA/PVAH 在 SIGS 术中抗结膜纤维瘢痕化的作用机制。

目前应用于滤过性手术中抗瘢痕形成的药物包括抗代谢、抗炎、抗细胞因子药物、生物制剂、基因治疗、中药等^[10]。临床应用较广泛的是抗代谢药物,其中最具有代表性的是丝裂霉素(mitomycin C, MMC)和 5-氟尿嘧啶,但个别出现严重的并发症如晚期伤口渗漏、持续性低眼压和眼内炎等^[11]。TA 作为一种中效糖皮质激素,可通过抗炎和免疫抑制作用、血管收缩以及抗有丝分裂作用而抑制成纤维细胞形成来抑制瘢痕形成^[12]。TA 的作用机制为抑制 TGF- β 1、血管内皮生长因子等细胞因子的转化及表达,上调 b-FGF 的表达,还可以直接抑制成纤维细胞 DNA,加快胶原分解,促使瘢痕组织萎缩^[13]。

本研究将实验兔分为 Trab 组、SIGS 组、PVAH 组、TA/PVAH 组四组进行观察,术后滤过泡的表现:术后 2 wk,TA/PVAH 组均保持了弥散隆起的功能性滤过泡,而其它各组均出现扁平滤过泡。术后 4 wk,Trab 组和 SIGS 组滤过泡基本消失,仅有 PVAH 组和 TA/PVAH 组各有 1 眼和 2 眼保持了功能性滤过泡。所有 SIGS 术眼均未出现滤过泡相关的并发症。

本实验通过组织病理学观察了各组在不同时间点的滤过道新生胶原纤维的增殖情况以及 I 型和 III 型胶原纤维的增殖情况。从 Masson 染色看:术后 4 wk,PVAH 组和 TA/PVAH 组水凝胶均未降解,相对于 Trab 组和 SIGS 组,滤过道更为明显,有较少胶原纤维增生。从天狼星红染色看:术后 4 wk,与 Trab 组和 SIGS 组相比,PVAH 组和 TA/PVAH 组的 I 型胶原和 III 型胶原的表达更少,尤其 TA/PVAH 组表达明显减少。说明 TA/PVAH 缓释片可能通过抑制 I 型和 III 型胶原纤维的形成,从而抑制滤过道瘢痕的形成。

通过免疫组化染色分析兔眼滤过道术后不同时间点 α -SMA、FGF2 的表达量。术后 1 wk,TA/PVAH 组 α -SMA 表达较 Trab 组、SIGS 组和 PHAP 均明显降低(均 *P*<0.01);术后 2 wk,Trab 组和 SIGS 组 α -SMA 表达最高,而 TA/PVAH 组 α -SMA 表达较前三组均显著降低

(*P*<0.01)。说明 TA/PVAH 缓释片可在术后早期降低结膜组织中 α -SMA 的表达,起到抑制成纤维细胞增生,阻止纤维瘢痕形成的作用。

与 Trab 组相比,TA/PVAH 组术后 1、2、3、4 wk FGF2 表达均明显升高(均 *P*<0.05);与 SIGS 组相比,TA/PVAH 组术后 4 wk FGF2 表达明显升高(*P*<0.05)。说明与小梁切除术相比,SIGS 联合结膜下植入 TA/PVAH 缓释片在术后早期可升高结膜组织中 FGF2 的表达。

综上所述,本实验通过在兔眼的 SIGS 术中联合应用一种负载 TA 的聚乙烯醇水凝胶缓释片,探究其抗瘢痕化作用以及安全性。研究结果表明 SIGS 较传统小梁切除术能在一定程度减轻术后结膜纤维瘢痕化,术后并发症少,安全性高。本研究中利用水凝胶作为载体,将 TA 负载于水凝胶薄片,得到载药量大、缓释时间长的 TA/PVAH 缓释片。研究表明,SIGS 联合结膜瓣下填充 TA/PVAH 缓释片有助于建立一个有效的房水外流通道,其中水凝胶薄片在术后 1 mo 内能发挥一定的空间支撑作用,多微孔结构不影响房水的正常滤过,且具有药物缓释能力,通过 TA 抗炎、抑制成纤维细胞增生等作用来抑制结膜下滤过通道的纤维瘢痕化。二者联合对于抑制胶原纤维形成,维持滤过泡形态和功能是可行的,在体内未见严重并发症发生,体外未显示潜在的细胞毒性。既往研究也发现:小梁切除术中联合巩膜瓣下植入曲安奈德/聚乳酸己内酯载药静电纺丝膜可明显抑制手术区滤过道瘢痕化^[14]。负载 MMC 的聚三亚甲基碳酸酯(PTMC)-F127-PTMC 的温敏型水凝胶缓释剂在体外可缓释 MMC 达 20 d 以上,将 0.05、0.10、0.20 g/L 质量浓度梯度的水凝胶(0.1 mL)注射于 Tenon 囊内能够有效延长滤过泡的生存时间,调控兔眼小梁手术后的瘢痕化^[15]。本文就 TA/PVAH 缓释片抑制结膜瓣下瘢痕增生的机制本研究也进行了初步的探讨,认为可能与 FGF2 通路有关,后者可通过抑制 TGF- β 1 介导的成纤维细胞激活降低瘢痕组织中 α -SMA、I 型胶原纤维等的表达,从而达到抗纤维化的作用,关于此推论尚需进一步实验进行验证。

本研究对结膜瓣下填充 TA/PVAH 缓释片在兔眼 SIGS 手术中抗瘢痕化作用进行观察和评价,并对其机制进行了初步的探讨。从一定程度上证明了这种方法可有效抑制 SIGS 术后结膜瓣下滤过道瘢痕化。该方法操作简单,安全性高,为青光眼手术治疗提供了一种新的

思路和实验依据,有一定的应用价值。但由于实验动物数量及观察时间等条件所限,且未对高眼压模型进行降眼压疗效的评估,存在一定的不完善之处,还有待进一步深入的研究。

参考文献

[1] Francis BA, Du LT, Najafi K, et al. Histopathologic features of conjunctival filtering blebs. *Arch Ophthalmol*, 2005,123(2):166-170.

[2] Jacob S, Agarwal A. Stab incision glaucoma surgery offers alternative to trabeculectomy. *Ocular surgery news U.S*, Edition, 2014.

[3] Jacob S, Figus M, Ashok Kumar D, et al. Stab incision glaucoma surgery; a modified guarded filtration procedure for primary open angle glaucoma. *J Ophthalmol*, 2016,2016:2837562.

[4] 吕永川. 曲安奈德注射液结膜下注射在青光眼滤过术中的疗效观察. *黑龙江医学*, 2020,44(2):177-178.

[5] CAT- Trabeculectomy Study Group, Khaw P, Grehn F, et al. A phase III study of subconjunctival human anti-transforming growth factor beta(2) monoclonal antibody (CAT-152) to prevent scarring after first-time trabeculectomy. *Ophthalmology*, 2007,114(10):1822-1830.

[6] 何宇, 曾流芝, 荆琳, 等. 穿刺切口青光眼手术(SIGS)治疗成人青光眼的临床观察. *国际眼科杂志*, 2022,22(9):1554-1558.

[7] Lin X, Wen J, Liu R, et al. Nintedanib inhibits TGF- β -induced myofibroblast transdifferentiation in human Tenon's fibroblasts. *Mol Vis*, 2018,24:789-800.

[8] Dolivo DM, Larson SA, Dominko T. FGF2-mediated attenuation of myofibroblast activation is modulated by distinct MAPK signaling pathways in human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*, 2017,88(3):339-348.

[9] Batenburg NL, Thompson EL, Hendrickson EA, et al. Cockayne syndrome group B protein regulates DNA double-strand break repair and checkpoint activation. *EMBO J*, 2015,34(10):1399-1416.

[10] 王玲, 樊芳, 贾志旸. 青光眼滤过性手术抗瘢痕化治疗的研究进展. *眼科新进展*, 2020,40(11):1084-1089,1096.

[11] 景金霞, 哈少平. α -2b 干扰素与 5-氟尿嘧啶在青光眼滤过手术中抗瘢痕作用的对比研究. *中华眼外伤职业眼病杂志*, 2011,33(4):264-267.

[12] 孔彦月. 曲安奈德注射液在眼科的临床使用. *中国实用医药*, 2012,7(13):160-162.

[13] Bi M, Sun P, Li D, et al. Intralesional Injection of Botulinum Toxin Type A Compared with Intralesional Injection of Corticosteroid for the Treatment of Hypertrophic Scar and Keloid: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Med Sci Monit*, 2019,25:2950-2958.

[14] 郑玉强, 王卓实, 徐玲, 等. 曲安奈德/聚乳酸己内酯载药静电纺丝膜的抗兔眼滤过泡瘢痕化作用. *中华实验眼科杂志*, 2016,34(7):585-590.

[15] 席蕾, 赵峰, 王涛, 等. MMC 的 PTMC-F127-PTMC 温敏型水凝胶缓释剂对兔小梁切除术后滤过泡瘢痕化的调控作用. *中华实验眼科杂志*, 2014,32(6):506-511.