

汉防己甲素联合 5-FU 聚乳酸微球对兔 PVR IL-1 β 和 TNF- α 表达的影响

解孝锋, 毕宏生, 吴建峰, 卢秀珍

基金项目: 中国山东省自然科学基金资助项目(No. Y2006C100)
作者单位: (250002) 中国山东省济南市, 山东中医药大学第二附属医院眼科中心 山东中医药大学眼科研究所
作者简介: 解孝锋, 博士, 主治医师, 中国中西医结合眼科专业委员会青年委员, 山东省中西医结合眼科专业委员会委员, 研究方向: 白内障。
通讯作者: 毕宏生, 教授, 博士研究生导师, 中国中西医结合眼科专业委员会副主任委员, 中华眼科学会委员, 山东省医师协会眼科分会主任委员, 山东省中西医结合眼科分会主任委员, 研究方向: 白内障. yankeboshi@126.com
收稿日期: 2010-04-23 **修回日期:** 2010-06-10

The change of IL-1 β and TNF- α expression by Tet combined 5-FU polylactic acid microspheres on rabbit proliferative vitreoretinopathy

Xiao-Feng Xie, Hong-Sheng Bi, Jian-Feng Wu, Xiu-Zhen Lu

Foundation item: Natural Foundation of Shandong Province, China (No. Y2006C100)
Institute of Ophthalmology, Traditional Chinese Medicine Centre of Shandong University, the Second Affiliated Hospital of Shandong Traditional Chinese Medicine University, Jinan 250002, Shandong Province, China
Correspondence to: Hong-Sheng Bi. Institute of Ophthalmology, Traditional Chinese Medicine Centre of Shandong University, the Second Affiliated Hospital of Shandong Traditional Chinese Medicine University, Jinan 250002, Shandong Province, China. yankeboshi@126.com
Received: 2010-04-23 Accepted: 2010-06-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the change of the IL-1 β and TNF- α expression by tetrandrine (Tet) combined 5-fluorouracil (5-FU) polylactic acid microspheres on the rabbit proliferative vitreoretinopathy (PVR).
• **METHODS:** Ocular trauma PVR rabbit model was constructed. These rabbits were divided randomly into three groups: A group was injected Tet and 5-FU BSS polylactic acid microspheres (0.2 mL) into posterior vitreous; B group was injected 5-FU BSS polylactic acid microspheres 0.2 mL into posterior vitreous, C group was injected drug-free polylactic acid 25mg microspheres BSS 0.2 mL into posterior vitreous. After injection, fundus observation was performed every day up to 28 days, and B ultrasonic inspection was used. At postoperative day 7, 14 and 28, vitreous humor (0.2 mL) was extracted from posterior vitreous, and enzyme-linked immunosorbent

assay (ELISA) detection of TNF- α and IL-2 was used.
• **RESULTS:** Compared Tet combined 5-FU polylactic acid microspheres group with 5-FU group of polylactic acid microspheres or microspheres group, TNF- α and IL-2 content in vitreous humor in Tet combined 5-FU polylactic acid microspheres group was significantly lower than that in the other two groups ($P < 0.01$). There were significantly statistical differences.
• **CONCLUSION:** Tet can reduce inflammatory mediators TNF- α and IL-1 β expression, which indicates that Tet may play an anti-inflammatory role in the PVR. Tet has many advantages such as inhibiting the release of inflammatory factors, decreasing inflammatory cytokines activation and chemotaxis on the inflammatory cells. All this results in the decrease of the recurrence rate of PVR.
• **KEYWORDS:** tetrandrine; 5-FU polylactic acid microspheres; IL-1 β ; TNF- α ; proliferative vitreoretinopathy

Xie XF, Bi HS, Wu JF, et al. The change of IL-1 β and TNF- α expression by Tet combined 5-FU polylactic acid microspheres on rabbit proliferative vitreoretinopathy. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(7):1266-1268

摘要

目的: 探讨汉防己甲素(tetrandrine, Tet)联合 5-FU 聚乳酸微球对兔增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR) IL-1 β 和 TNF- α 表达的影响。
方法: 随机分为 A, B, C 3 组, 建立兔眼外伤性 PVR 模型, 向玻璃体中后部注入药物, A 组注入含有 Tet 联合 5-氟尿嘧啶(5-FU) 聚乳酸微球的 BSS 悬浮液 0.2 mL, B 组注入含有 5-FU 聚乳酸微球的 BSS 悬浮液 0.2 mL, C 组注入 25mg 无药物聚乳酸微球的 BSS 悬浮液 0.2 mL, 术后每天观察眼底变化, 必要时行 B 超检查直到注药后第 28d。分别于术后 7, 14, 28d 等 3 个时间点抽取各术眼玻璃体液 0.2 mL, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测玻璃体液中 TNF- α , IL-2 的含量。
结果: Tet 联合 5-FU 聚乳酸微球组与 5-FU 聚乳酸微球组及空白微球组相比, 其玻璃体液中 TNF- α , IL-2 等炎症因子的含量也显著低于其他两组, 方差分析 $P < 0.01$, 差异有统计学意义。
结论: Tet 在眼内能够降低炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达, 说明 Tet 可能通过在 PVR 炎症期发挥抗炎作用, 抑制眼内炎症因子的释放, 减弱炎症因子对炎症细胞的激活和趋化, 从而起到降低 PVR 发生率的协同作用。
关键词: 汉防己甲素; 5-FU 聚乳酸微球; IL-1 β ; TNF- α ; 增生性玻璃体视网膜病变
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.07.009

解孝锋, 毕宏生, 吴建峰, 等. 汉防己甲素联合 5-FU 聚乳酸微球对兔 PVR IL-1 β 和 TNF- α 表达的影响. 国际眼科杂志 2010;10(7):1266-1268

0 引言

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是指在孔源性视网膜脱离或视网膜复位术后, 视网膜细胞增生和收缩造成牵拉性视网膜病变。研究认为 PVR 属于眼内发生的过度损伤修复反应, 这是一个以时相为特征的程序化过程, 可分为炎症期、增生期和瘢痕期 3 个阶段。炎症期表现为视网膜裂孔形成后血-视网膜屏障破坏, 血浆蛋白和活性介质释放; 增生期 RPE 细胞释放并开始增生; 瘢痕期细胞增生达到相当程度, 形成瘢痕化膜, 增生膜收缩引起牵拉性视网膜脱落。此 3 个阶段并不是孤立的, 而是相互作用, 互为因果, 形成恶性循环, 促使 PVR 向最严重的后果发展。在这个过程中, 细胞的迁徙和增生是 PVR 的始动因素和关键环节, 并且还有大量细胞因子和细胞外基质参与其中^[1-3]。目前, 临床上治疗 PVR 的主要手段是玻璃体视网膜手术。近 20a 来, 虽然玻璃体视网膜手术的技术水平和仪器设备均有了巨大的发展, 但治疗效果并不理想。玻璃体视网膜手术治疗时, 患眼 PVR 大多发生到瘢痕期, 手术治疗只能切除已经形成的增生膜, 并不能完全清除 PVR 形成的关键因素。另外, 手术本身也是一种创伤, 同样也会造成炎症反应和细胞迁徙, 在切除增生膜时也可能诱发 PVR。因此, 手术治疗 PVR 干预时机较晚, 只是对症治疗, 治标不治本。我们需要探索新的治疗手段, 在 PVR 的始发期就给予干预, 抑制炎症反应和细胞增生, 阻止其向瘢痕期发展, 药物治疗一直是临床医生最期望的选择。我们前期实验中已经证明 5-FU 聚乳酸微球具有眼内缓释, 持续抑制 PVR 的作用^[4]。针对以上问题, 我们将广谱抗炎和抑制细胞增殖等作用的中药单体 Tet 和抗代谢 5-FU 联用, 并制成聚乳酸微球的缓释剂型, 研究证实具有防治实验性 PVR 的作用, 我们探讨 Tet 与 5-FU 微球对实验性 PVR 进程中细胞增殖和炎性因子的影响及作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 眼底照相机: 拓普康 (日本); 伯乐型酶标仪 (美国 BIO-RAD); 必施: Alcon 公司 (美国); 复方托吡卡胺滴眼液 (美多丽); 参天制药株式会社 (日本); 盐酸奥布卡因滴眼液; 参天制药株式会社 (日本); ELISA 检测试剂盒: ADL 公司产品; 标准品的浓度: 0, 3. 125, 6. 25, 12. 5, 25, 50, 100, 200, 400ng/L。

1.2 方法 健康成年青紫蓝兔 48 只, 体质量 2. 5 ~ 3. 5kg, 雌雄不限, 随机分为 A, B, C 3 组, 每组 16 兔 32 眼。A 组为 Tet-5-FU-CS-MS 实验组, B 组为 5-FU 聚乳酸微球 (5-FU-PLA-MS) 实验组, C 组为空白壳聚糖微球对照组。动物模型的建立: 使用复方托吡卡胺滴眼液散瞳, 10min 1 次, 共 3 次; 氯胺酮 (45mg/kg) 和氯丙嗪 (10mg/kg) 混合后行肌肉注射麻醉。以 5mL 注射器抽取兔耳缘动脉血 5mL, 离心 1500r/min, 5min, 制备富含血小板的血浆 (血小板密度为 $2. 24 \times 10^{11} \sim 2. 71 \times 10^{11}/L$), 用 1mL 注射器抽吸 0. 4mL 此血浆备用。显微镜下分离兔左眼上方 9: 00 ~ 3: 00 位的球结膜, 将巩膜表面的结膜下组织清除干净, 在角膜缘后 3 ~ 4mm 处用巩膜穿刺刀刺向玻璃体中心部, 勿伤及晶状体及周边视网膜, 用剪刀向两侧扩大切口, 切口与角膜缘平行, 达 8mm, 轻压眼球, 将脱出的玻璃体剪除, 玻璃体腔注入 0. 4mL 含血小板的血浆后, 用 8-0 尼龙线间断缝合切口。检查眼底, 排除眼内出血及视网膜脱离。术毕, 结膜囊内涂红霉素眼膏。PVR 动物模型建立后 2d, 按上述麻醉方法重新麻醉, 显微镜下, 在角膜缘后 4mm 穿刺, 用灌注管抽取玻璃体 0. 2mL 后, 分别向 3 组实验家兔玻璃体

中后部注入药物建立动物模型。A 组注入含有 Tet-5-FU-CS-MS 的 BSS 悬浮液 0. 2mL (相当与 25mg 微球, 含有 5-FU 2. 6mg, Tet 4. 2mg), B 组注入含有 5-FU 聚乳酸微球的 BSS 悬浮液 0. 2mL (相当于含有 5-FU 2. 6mg), C 组注入 25mg 无药物壳聚糖微球的 BSS 悬浮液 0. 2mL, 8-0 线缝合穿刺口。术毕, 结膜囊内涂红霉素眼膏。术后 7, 14, 28d 等 3 个时间点, 将实验兔用上述方法麻醉后, 妥布霉素注射液混合生理盐水冲洗结膜囊, 在眼科显微镜下用 4 $\frac{1}{2}$ 号注射器针头在颞上象限角膜缘后 4mm 处穿刺, 分

别抽取各术眼玻璃体腔液体 0. 2mL, 术后氧氟沙星眼药水点眼, 4 次/d, 共 3d, 防止感染。根据待测样品的数量和标准品的数量决定所需要的板条数; 取出酶标板, 依照次序对应分别加入 50 μ L 的标准品和待测样品分别于反应孔内; 在标准孔和样品孔中加入 50 μ L 的酶标偶合溶液。盖上膜板, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h; 甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 振荡 30s, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干, 重复此操作 4 次; 每孔加入底物 A, B 各 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 15min, 避免光照; 取出酶标板, 迅速加入 50 μ L 的中止液, 加入中止液后立即测定结果; 于 450nm 波长处测定各孔的 A 值。以吸光度 A 值为纵坐标 (Y), 相应的 IL-1 β 和 TNF- α 标准浓度为横坐标 (X), 做得相应的曲线, 样品的 IL-1 β 和 TNF- α 含量可根据其 A 值由标准曲线计算出相应的浓度。

统计学分析: 采用 SPSS 16. 0 软件对计量资料行 *t* 检验及多样本均数间的方差分析, $P < 0. 05$ 为显著性检验标准。

2 结果

2.1 玻璃体液中 IL-1 β 的水平 A (Tet-5-FU-CS-MS) 组与 B (5-FU 聚乳酸微球) 组玻璃体液中 IL-1 β 的浓度明显低于 C (空白微球组) 组。应用多样本均数间的方差分析显示, 术后 7d, 3 组间比较 $F = 448. 703, P < 0. 000$, A 组与 B 组, A 组与 C 组, B 组与 C 组差异有统计学意义。术后 14d, 3 组间比较 $F = 2. 183E3, P < 0. 000$, A 组与 B 组, A 组与 C 组, B 组与 C 组差异有统计学意义。术后 28d, 3 组间比较 $F = 1. 554E3, P < 0. 000$, A 与 B 组, A 组与 C 组, B 组与 C 组, 差异有统计学意义 (表 1)。

2.2 玻璃体液中 TNF- α 的水平 A 组 (Tet-5-FU-CS-MS) 与 B 组 (5-FU 聚乳酸微球) 玻璃体液中 TNF- α 的浓度明显低于 C 组 (空白微球组), 应用多样本均数间的方差分析显示, 术后 7d, 3 组间 A 组与 B 组, A 组与 C 组, B 组与 C 组比较 $F = 407. 163, P < 0. 000$, 差异有统计学意义。术后 14d, 3 组间 A 组与 B 组, A 组与 C 组, B 组与 C 组比较 $F = 4. 497E3, P < 0. 000$, 差异有统计学意义。术后 28d, 3 组间 A 组与 B 组, A 组与 C 组, B 组与 C 组比较 $F = 7. 752E3, P < 0. 000$, 差异有统计学意义 (表 1)。

3 讨论

药物治疗是近年来 PVR 防治研究的热点和主流趋势, 目前较多集中在西药领域, 主要有抗代谢药 (如 5-FU, 道诺霉素)、皮质类固醇、维生素及其衍生物: (如维生素 A 的衍生物维甲酸、维生素 E 及其衍生物琥珀酸生育酚)^[5]、抑制细胞外基质合成的药物 (如 Cis-羟脯氨酸和曲尼司特), 细胞信号转导抑制剂 (如维拉帕米和苏拉明)^[6]。尽管目前许多治疗 PVR 的药物在动物实验研究中取得了显著的疗效, 但多数药物在临床研究中未能取得显著的效果。当前需要解决的主要问题有: (1) 在治疗中选择恰当的时机。在动物实验中给药时间多选择在诱导 PVR 的同时, 而临床上往往是在 PVR 已形成时给药, 这可能是药物在临床应用的效果不如动物实验效果的原因之一。

表1 玻璃体液中 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 32, \text{ng/L}$)

分组	术后 7d	术后 14d	术后 28d	
IL-1 β	A 组(Tet-5-FU-CS-MS)	188 \pm 72	156 \pm 53	104 \pm 48
	B 组(5-FU 聚乳酸微球)	316.3 \pm 35.2 ^b	259.0 \pm 76.3 ^b	192 \pm 44 ^b
	C 组(空白微球组)	427.8 \pm 107.40	522.42 \pm 89.78	381.53 \pm 91.96
TNF- α	A 组(Tet-5-FU-CS-MS)	240 \pm 32	128.83 \pm 24.12	90.95 \pm 32.25
	B 组(5-FU 聚乳酸微球)	346 \pm 63 ^b	221.38 \pm 57.76 ^b	113.1 \pm 26.38 ^b
	C 组(空白微球组)	462.08 \pm 85.42	498.2 \pm 108.41	476.4 \pm 97.94

^b $P < 0.01$ vs A, C 组。

目前的临床资料显示无论是初发的 PVR 还是复发的 PVR 大多在诱因存在的 1 ~ 2mo 内即已形成,这一结论对临床上选择给药时间提供了有益的启示。(2) 如何使药物在视网膜表面达到有效浓度,并持续足够的时间。PVR 的发展是一个持续的过程,如采用全身给药或局部一次性给药,很可能由于在视网膜表面达不到有效浓度或有效浓度维持时间不够而不能完全抑制 PVR 的形成。选择药物的可生物降解剂型或缓释剂型可使这一问题得到妥善解决。(3) 由于在 PVR 的形成过程中有多种因素起作用,因而使用只针对某一因素的药物难以控制 PVR 的发展,因此有必要研究多种作用于不同发病因素药物的联合应用来提高 PVR 的治疗效果,但是药物治疗目前仍存在反复眼内给药,不能维持局部有效浓度和单一用药效果不佳问题,影响了其进一步的临床应用。针对以上问题,如能将不同作用机制的多种药物联合应用并制成缓释制剂应能取得更好的效果。我们在前期进行的实验中证明 5-FU 聚乳酸微球具有眼内缓释,持续抑制 PVR 的作用,因此我们将广谱抗炎和抑制细胞增殖等作用的中药单体汉防己甲素和抗代谢 5-FU 联用,并制成聚乳酸微球的缓释剂型,研究其防治实验性 PVR 的作用,并分析其对 PVR 进程中细胞增殖和炎症因子的影响及作用机制。

在建立外伤性 PVR 模型时,我们建议选择角膜缘后 3mm 巩膜切口;同时,在行巩膜穿刺及含血小板的血浆玻璃腔注射时,刀锋和注射针头进入眼内时方向不应与球壁垂直,而应朝向眼底后极部。这样可以大大降低并发性白内障的发生率,有利于观察病变的发展变化,同时不降低 PVR 的发生率。汉防己甲素(Tet)又称粉防己碱,是千金藤属防己科植物粉防己的干燥根中提取的双苄基异喹啉类化合物,是粉防己的主要活性成分。近年来,国内外对其药理作用机制进行的研究表明,Tet 具有 Ca²⁺ 通道阻滞、钙调蛋白(CaM)拮抗、调节机体免疫、抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡和逆转多药耐药(multi-drug resistance, MDR)等广泛的生物学效应^[7]。近年来 Tet 在眼部疾病治疗的基础研究上取得了较大的进展,在减轻眼部炎症、抑制眼部肿瘤的实验研究中取得了良好的效果,而且已经证明 Tet 对兔结膜成纤维细胞的增殖具有一定的抑制作用^[8]。针对外伤性 PVR 玻璃体中存在的炎症因子进行的大量的基础和临床研究显示,在增生性玻璃体视网膜病变中,炎症因子如 IL-6, IL-1 β 及 TNF- α 等随着 PVR 程度的增加而升高,参与了 PVR 的免疫反应过程,与 PVR 的发生发展有着密切的关系。IL-1 β 是 T 细胞产生的免疫活性因子之一,也是目前研究应用最广泛的一种白细胞介素。它是促使 T 细胞从 G1 期至 S 期的关键性因子,能激活巨噬细胞,辅助性 T 淋巴细胞,细胞毒淋巴细胞等多种细胞,同时激活 B 细胞促进其增生分化产生抗体。TNF- α 主要有活化的单核巨噬细胞产生,并可刺激单核吞噬细胞合

成。IL-1, IL-6, IL-8 等具有广泛的生物学活性,它可以促进单核细胞浸润,激活炎症细胞,同时本身也具有细胞生长因子的作用。对介导多种细胞因子发挥炎症早期免疫反应有重要作用^[9,10]。

本实验中,A 组(Tet-5-FU-CS-MS 组)玻璃体液中 IL-1 β 与 TNF- α 的含量明显低于 B 组(5-FU 聚乳酸微球)与 C 组(空白微球组),差异有统计学意义($P < 0.000$)。说明 Tet 在 PVR 炎症期发挥广谱抗炎作用,抑制眼内炎症因子的释放,减弱炎症因子对炎症细胞的激活和趋化,从而防止 PVR 的形成。同时 Tet 可以抑制或下调 IL-1 β , TGF- β , TNF- α 等细胞因子的表达,具有类似糖皮质激素样的抗炎作用。这种药理活性可能使其在 PVR 的炎症期发挥了抑制作用。再者,Tet 可以抗革兰阳性菌,对一些病毒和真菌也有抑制作用,这种药理活性降低了玻璃体内注射所致眼内感染的风险。

综上所述,通过成功建立兔眼实验性 PVR 模型,并将 Tet-5-FU-CS-MS 植入眼内,证明了该制剂防治实验性 PVR 的效果明显;研究还发现 Tet 在眼内能够降低炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,说明 Tet 还有可能通过在 PVR 炎症期发挥抗炎作用,抑制眼内炎症因子的释放,减弱炎症因子对炎症细胞的激活和趋化,从而起到降低 PVR 发生率的协同作用。Tet-5-FU-CS-MS 有望成为一种较为理想的防治 PVR 的药物,值得进一步研究、开发和利用。

参考文献

- 1 Hooymans JM, de Lavalette VW, Oey AG. Formation of proliferative vitreoretinopathy in primary rhegmatogenous retinal detachment. *Doc Ophthalmol* 2000;100(1):39-42
- 2 毕宏生,崔彦,张建华,等. 5-氟尿嘧啶聚乳酸微球防治实验性增殖性玻璃体视网膜病变的效果观察. *中华眼科杂志* 2006;42:37-41
- 3 Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: An overview. *Sur Ophthalmol* 1998;43(1):3-18
- 4 Olaf Strauss. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiolrev* 2005;85: 845-881
- 5 Yang P, Brian S, McKay Janice B. Effect of NF- κ B inhibition on TNF- α -induced apoptosis in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2438-2446
- 6 Liou GI, Pakalnis VA, Matragoon S. HGF regulation of RPE proliferation in an IL-1beta/retinal hole-induced rabbit model of PVR. *Mol Vis* 2002; 8:494-501
- 7 Ikuno Y, Leong FL, Kazlauskas A. Attenuation of experimental proliferative vitreoretinopathy by inhibiting the platelet-derived growth factor receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41: 3107
- 8 Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development* 2003;130: 4769
- 9 Jin M, He S, Wörpel V. Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF- α . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41: 4324
- 10 Ikuno Y, Kazlauskas A. TGF β 1-dependent contraction of fibroblasts is mediated by the PDGF α Receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 41