

# 雷帕霉素缓释微球治疗干燥综合征性干眼的疗效评估

王 梦, 刘 焰

基金项目:上海市临床医学中心项目(No. QY040101);上海市卫生局科研课题(No. 2008164)

作者单位:(200080)中国上海市,上海交通大学附属第一人民医院眼科

作者简介:王梦,女,在读硕士研究生,研究方向:眼表疾病。

通讯作者:刘焰,女,复旦大学医学院博士,主任医师,硕士研究生导师,上海市器官移植临床医学中心角膜移植负责人,上海市视觉复明临床医学中心眼表面疾病负责人,中华医学会上海眼科分会角膜组副组长兼秘书,研究方向:眼表面疾病. liuyan0623@sina.com

收稿日期:2012-11-22 修回日期:2013-04-08

## Effect assessment of subconjunctival injection of rapamycin-loaded microspheres in non-obese diabetic mice with dry eye caused by Sjögren's syndrome

Meng Wang, Yan Liu

**Foundation items:** Shanghai Clinical Medicine Center Project, China (No. QY040101); Shanghai Health Bureau of Scientific Research, China (No. 2008164)

Department of Ophthalmology, Shanghai First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

**Correspondence to:** Yan Liu. Department of Ophthalmology, Shanghai First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China. liuyan0623@sina.com

Received:2012-11-22 Accepted:2013-04-08

### Abstract

• **AIM:** To study the effect of rapamycin-loaded microspheres in non-obese diabetic (NOD) mice with dry eye caused by Sjögren's syndrome (SS).

• **METHODS:** Twenty 8-week-old female NOD mice with dry eye caused by SS were randomly divided into 4 groups. One week later, the mice were treated with subconjunctival injection. Group I and II received 200 μg/kg and 400 μg/kg rapamycin-loaded microspheres, Group III and IV received normal saline and empty microspheres. Five 8-week-old female healthy KM mice were used as untreated controls. Before and 5, 10, 15, 20 days after the experiment, the amount of secretion of tears, the score of corneal fluorescein staining and rose bengal staining were investigated. Conjunctival epithelial cells were observed and graded by conjunctival impression cytology.

• **RESULTS:** Compared with the group III and IV, the amount of secretion of tears of the mice in group I and II increased. The scores of corneal fluorescein staining and

rose bengal staining were lower. The levels of conjunctival impression cytology reduced.

• **CONCLUSION:** Rapamycin-loaded microspheres can decrease dry eye signs by alleviating the ocular surface inflammation of NOD mice. It suggests rapamycin-loaded microsphere is valuable to dry eye caused by SS.

• **KEYWORDS:** rapamycin; microsphere; non-obese diabetic mice; Sjögren's syndrome; dry eye

**Citation:** Wang M, Liu Y. Effect assessment of subconjunctival injection of rapamycin-loaded microspheres in non-obese diabetic mice with dry eye caused by Sjögren's syndrome. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(5):861-864

### 摘要

**目的:**观察结膜下注射新型免疫抑制剂雷帕霉素缓释微球对NOD小鼠干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)性干眼临床体征的改善。

**方法:**SS性干眼的8周龄雌性NOD模型小鼠20只,随机分为4组,每组5只,9周龄时开始给药。另有5只8周龄健康KM小鼠作为正常对照组。实验I组和II组小鼠分别给予200 μg/kg和400 μg/kg的雷帕霉素缓释微球结膜下注射,实验III组和IV组动物分别给予生理盐水和空白微球载体结膜下注射。用药前及用药后第5, 10, 15, 20d检查各组小鼠的泪液分泌量,对角膜行荧光素染色并评分,对角膜行虎红染色并评分,用结膜印记细胞学方法检测结膜细胞并分级。

**结果:**实验组与对照组相比,泪液分泌量明显增加,角膜荧光素染色和角结膜虎红染色评分降低,结膜印记细胞学等级降低。

**结论:**雷帕霉素缓释微球可以通过抑制细胞免疫反应,增加NOD小鼠泪液分泌量,对NOD小鼠干燥综合征性干眼具有显著疗效。

**关键词:**雷帕霉素;微球;NOD小鼠;干燥综合征;干眼

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.05.06

**引用:**王梦,刘焰.雷帕霉素缓释微球治疗干燥综合征性干眼的疗效评估. *国际眼科杂志* 2013;13(5):861-864

### 0 引言

干眼病是眼科的常见疾病,近期研究资料表明其在欧美的患病率为11.0%~28.7%,亚洲的患病率为17.0%~34%<sup>[1]</sup>。造成干眼病的原因众多,干燥综合征性干眼是干眼病中的一种特殊类型<sup>[2]</sup>。干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)是一种主要累及外分泌腺体的慢性炎症性自身免疫病,眼部干燥是这类患者的重要临床表现。此外患者还有涎腺受损、功能下降而出现的口干,以及其他外

表1 实验组用药前后不同时间泪液分泌变化 ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}$ )

分组	用药前	第5d	第10d	第15d	第20d
I组	1.54±0.39	3.22±0.35	4.09±0.70	4.16±0.24	3.75±0.17
II组	1.63±0.26	5.60±0.33	5.23±0.59	5.20±0.15	5.51±0.47
III组	1.59±0.25	1.56±0.31	1.25±0.14	1.30±0.12	1.39±0.20
IV组	1.58±0.01	1.40±0.06	1.53±0.43	1.35±0.23	1.28±0.20

分泌腺、腺体外其他器官受累而出现多系统损害症状<sup>[3]</sup>。目前对于SS性干眼的治疗主要是通过补充局部水分和抗炎治疗。雷帕霉素(rapamycin, RAPA)是目前发现的免疫抑制作用最强的药物之一,抑制移植免疫排斥反应的效果较CsA强50倍,较FK506强30倍。由于RAPA亲合蛋白(FK506结合蛋白—FKBP)在眼部组织含量高,所以RAPA眼部制剂有可能成为新的临床治疗干眼症的有效药物<sup>[4,5]</sup>。本实验通过对SS性干眼小鼠结膜下注射新型免疫抑制剂雷帕霉素缓释微球,观察其干眼临床体征的改善,为临床治疗SS性干眼寻找新的出路。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 20只8周龄雌性NOD小鼠,体质量20±2g,购自上海斯莱克实验动物中心。使用条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。主要仪器AxioVerts100荧光显微镜(zeiss公司,上海市第一人民医院中心实验室提供),游标卡尺(上海市第一人民医院中心实验室提供),酚红棉线(Zone-Quick. SHOWA YAKUHIN KAKO CO., LTD),荧光素染色剂,虎红染色剂(Leiter's compounding pharmacy),丫啶橙粉末10G(Appllichem),硝酸纤维素膜(PALL)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组** 20只NOD小鼠按照给药不同分成4组,每组五只,左眼为实验眼,右眼为对照眼。另有5只8周龄健康KM小鼠作为正常对照组。

**1.2.2 药物制备** 雷帕霉素缓释微球<sup>[6]</sup>:采用乳化-溶剂挥发(O/W)法制备。将不同质量比的雷帕霉素和PHBV完全溶解于4mL三氯甲烷中,室温下超声10min后混匀的白色均匀乳液作为油相;水浴明胶溶液、油相至不同温度后,恒温恒速条件下,1mL注射器分4次缓慢注入40mL不同浓度的明胶溶液中,搅拌4h至有机溶剂完全挥发微球固化,冷无菌去离子水洗涤制备容器3次(至黏附在容器壁上的微球大部分被洗脱下),真空抽滤混悬液得干燥雷帕霉素微球。

**1.2.3 给药方法** NOD实验小鼠9周龄时开始左眼结膜下给药。I组和II组分别给予200μg/kg和400μg/kg的雷帕霉素缓释微球结膜下注射,III组和IV组小鼠分别给予生理盐水和空白微球载体结膜下注射。KM小鼠组不作处理。

**1.2.4 泪液分泌测试** 在用药前及用药后第5,10,15,20d使用酚红棉线检测小鼠泪液分泌量,在实验前直接检测KM小鼠组泪液分泌量,检测在无局部麻醉和全身麻醉下用眼科显微镊将酚红棉线置于小鼠眼外眦部下结膜穹隆处。15s后取出酚红棉线,利用游标卡尺测量酚红棉线染色(由黄色变为红色)的长度。

**1.2.5 角膜荧光素染色** 用毛细吸管将5%荧光素钠溶液0.5μL滴入小鼠结膜囊内,5min后裂隙灯显微镜钴蓝光下观察小鼠角膜染色情况并评分。角膜按照0~4级的标

准分级系统进行染色评分(0级:全角膜无染色;1级:1/8以内被染色;2级:1/4以内被染色;3级:1/2以内被染色;4级:大于1/2被染色)<sup>[7]</sup>。固定人员以单盲方式记录。

**1.2.6 角结膜虎红染色** 用毛细吸管将1%虎红溶液0.5μL滴入小鼠结膜囊内,5min后裂隙灯显微镜下观察小鼠角结膜染色情况并评分。将睑裂区眼表分为鼻侧球结膜、颞侧球结膜及角膜3个区,每区按0,1,2,3评分,共计9分。其中0分,无染色;1分,染色在10个点以下;2分,染色在10个点上且30个点以下;3分,染色在30个点上或呈片状<sup>[8]</sup>。

**1.2.7 结膜印记细胞学检查** 检查前结膜囊先滴0.4%盐酸奥布卡因1滴,5min后滤纸吸去结膜囊泪液,将剪好的3mm×3mm硝酸纤维膜的粗糙面贴于距上方角膜缘2mm的球结膜表面,轻轻加压,3~4s之后取出,然后与其左右相邻的区域再各贴一张,印有细胞一面向上放在载玻片上滴加1~2滴0.01%丫啶橙生理盐溶液,染色3~5min后,盖上盖玻片,置于荧光显微镜下观察。使用的激发滤片是BG-12激光滤片。根据滤纸片上细胞附着多寡,分别观察1~3个视野,参考目前公认的Nelson's<sup>[9]</sup>分类法进行分级,具体标准:鳞状上皮化生分为4个级别,0级:正常;1级:轻度;2级:中度;3级:重度。

统计学分析:应用SPSS 16.0统计软件进行分析,计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )描述,采用单因素方差分析及均数多重比较检验,分析用药前后观察期各项指标的变化及组间各项指标平均值的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 泪液分泌测试** 正常组小鼠泪液分泌量6.22±0.24mm,用药前正常组和干眼组泪液分泌有显著差异( $P < 0.01$ )。用药前各干眼组小鼠泪液分泌量无差异( $P > 0.05$ ),用药后第5d实验I组和II组小鼠泪液分泌量较用药前显著增多( $P < 0.01$ ),且II组泪液分泌量比I组增多( $P < 0.01$ )。III组和IV组较用药前无差别。用药15d I组泪液分泌量均值达最大,第20d和15d相比泪液有所减少,但仍旧比用药前增多。用药后II组泪液分泌量均比I组增多( $P < 0.05$ )。III组用药前与用药后均无差别。IV组第15d和20d均比用药前泪液分泌有所减少( $P < 0.05$ ,表1)。

**2.2 小鼠用药前后角膜荧光素染色分级变化** 正常组小鼠角膜荧光素钠染色均为0级(图1A),用药前各干眼组小鼠角膜荧光素染色分级无差异,均为4级(图1B),用药后实验I组和II组小鼠角膜荧光素钠染色均较用药前减轻,分级在1~3级之间不等(图1C,D),约占85%左右。用药后实验III组和IV组小鼠角膜荧光素钠染色与用药前无差异(图1E),用药后实验I组和II组小鼠角膜荧光素钠染色均较实验III组和IV组减轻。

**2.3 小鼠用药前后角结膜虎红染色评分变化** 虎红染色主要着染已失去活性变性的细胞、缺乏黏蛋白覆盖的角结



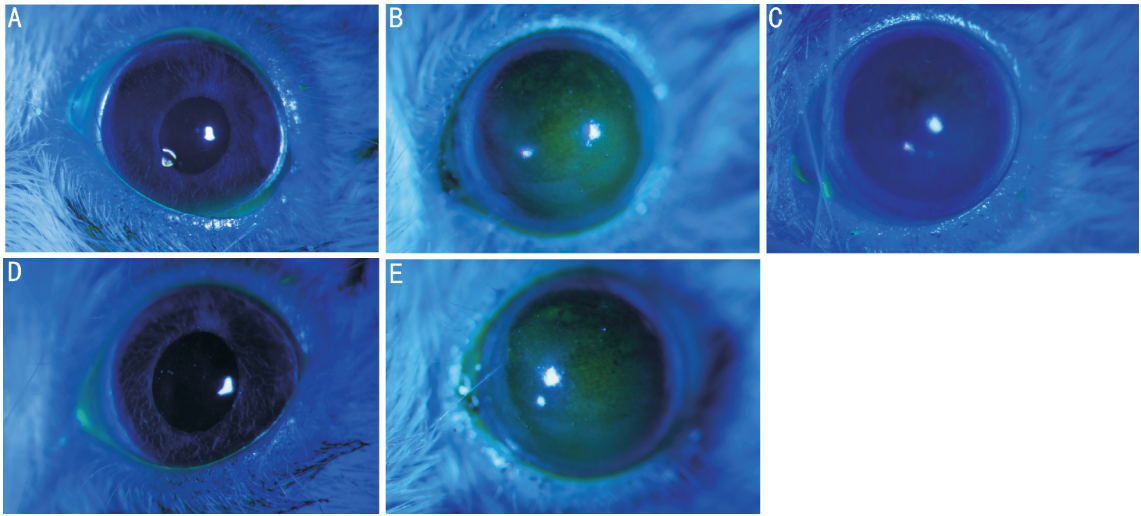


图1 小鼠用药前后角膜荧光素染色变化 A:正常小鼠(0级);B:用药前 NOD 小鼠(4级);C:用药后第10d 实验 I 组(3级);D:用药后第15d 实验 II 组(1级);E:用药后第15d 实验 III 组(4级)。

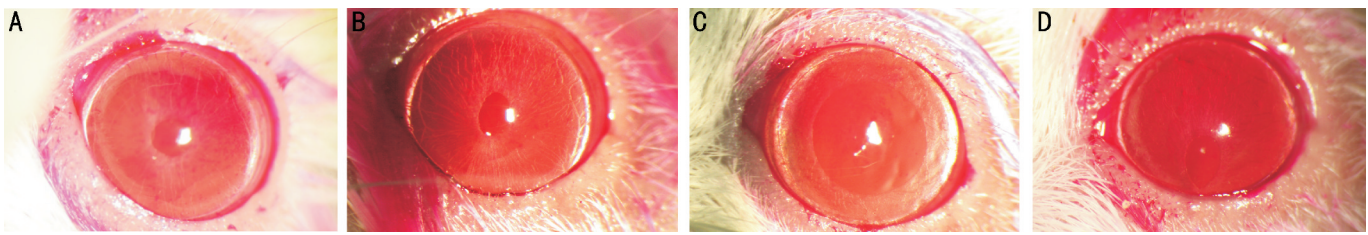


图2 小鼠用药前后角结膜虎红染色变化 A:用药前 NOD 小鼠(9分);B:用药后第10d I 组(6分);C:用药后第10d II 组(4分);D:用药后第15d IV 组(9分)。

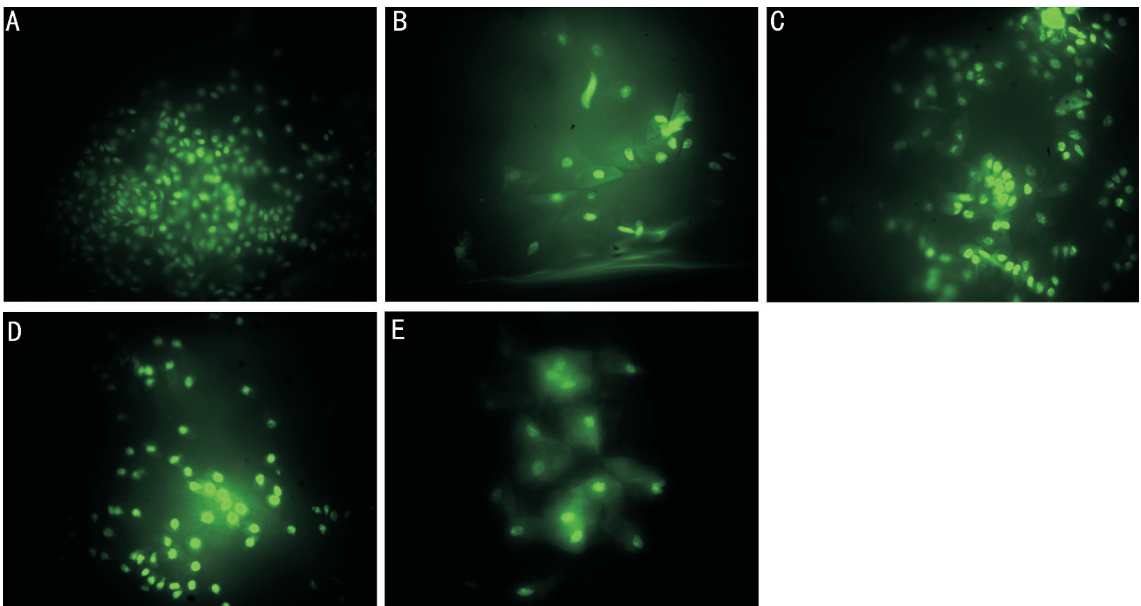


图3 小鼠结膜上皮细胞分级变化 A:正常组 KM 小鼠(0级);B:用药前 NOD 小鼠(3级);C:用药后第10d II 组小鼠(1级);D:用药后第10d I 组小鼠结膜上皮细胞(2级);E:用药后第15d III 组小鼠结膜上皮细胞(3级)。

膜上皮细胞和黏液,是评估泪膜中黏蛋白较敏感的指标。用药前正常组和干眼组角结膜虎红染色评分有显著差异 ( $P < 0.01$ )。各干眼组小鼠角结膜虎红染色评分无差异 ( $P > 0.05$ ,图 2A),用药后第5d 实验 I 组和 II 组小鼠较用药前减轻 ( $P < 0.01$ ),II 组比 I 组评分降低 ( $P < 0.01$ )。III 组和 IV 组较用药前无差别 ( $P > 0.05$ )。至用药 20d I 组和 II 组角结膜虎红染色评分保持降低,且用药后 II 组均比 I 组降低。III 组和 IV 组用药前与用药后均无差别(图 2B ~ D,表 2)。

2.4 结膜印记细胞学 正常组结膜上皮细胞小而圆,数量

多且连接紧密,核圆形,核浆比约 1:1 ~ 1:2,杯状细胞外观类似“浆细胞”,核圆而大,强嗜碱性,偏向胞质一侧,数量丰富排列有序,表现为 Nelson 分级中的 0 级(图 3A);NOD 小鼠用药前表现为结膜上皮细胞重度鳞状化生,大而多形,孤立,核小固缩,核浆比大于 1:6,98.5%符合 Nelson 分级中的 3 级(图 3B)。用药后实验 I 组和 II 组表现结膜上皮细胞轻度或中度鳞状化生:稍分散,体积稍大而形态多变,84.1%表现为 Nelson 分级中的 1 级(图 3C)或 2 级(图 3D)。用药后实验 III 组和 IV 组较用药前分级无明显变化(图 3E)。

表2 各组用药前后不同时间虎红染色评分变化 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

分组	用药前	第5d	第10d	第15d	第20d
I组	7.80±0.84	5.40±0.55	4.00±0.70	4.00±0.24	3.80±0.84
II组	7.80±0.30	3.60±0.55	3.40±0.89	3.20±0.45	3.20±0.45
III组	7.80±0.84	7.20±0.45	7.60±0.55	7.80±0.84	8.20±0.84
IV组	8.20±0.83	8.00±0.71	7.80±0.84	8.00±0.71	8.00±0.50

### 3 讨论

NOD小鼠是一种具有自发胰岛素依赖型糖尿病倾向的小鼠,是近年来研究SS应用较多的动物模型。其血清中可检测到抗甲状腺抗体、抗胰岛β细胞抗体、抗腮腺和颌下腺的腺泡和导管上皮细胞抗体,也可检测到和人类SS发病相关的抗α-fodrin抗体,该抗体的存在和涎腺淋巴细胞浸润相关<sup>[10]</sup>。NOD小鼠不仅胰腺内有大量淋巴细胞浸润,而且在颌下腺、泪腺及其他器官也发现淋巴细胞浸润,且颌下腺和泪腺浸润的淋巴细胞中CD4<sup>+</sup>T细胞较CD8<sup>+</sup>T细胞和B细胞更显著。NOD小鼠淋巴细胞浸润进展是和抗体介导的分泌功能下降相伴随的,自身抗体在分泌功能丧失中的重要作用在人类SS中已到证实,这是其它已有SS动物模型所缺少的,因而认为NOD小鼠是研究SS较为理想的动物模型<sup>[11]</sup>。NOD小鼠在8wk时即可出现泪腺淋巴细胞浸润,并开始出现干扰素诱导蛋白-10(IP-10)和对活化和正常T细胞表达及分泌调控的蛋白质(RANTEs)mRNA的表达<sup>[12]</sup>。本实验就是利用NOD小鼠自身免疫性来研究SS性干眼,通过正常KM小鼠与NOD小鼠做对照证实NOD模型小鼠存在干眼并引起眼表损害。

雷帕霉素(rapamycin)亦称西罗莫司(sirolimus),是从吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)提取的一种亲脂性三烯含氮大环内酯抗生素类免疫抑制剂,具有高效免疫抑制作用,其IC<sub>50</sub>为环孢素A的1%<sup>[13]</sup>。RAPA是31元环所构成的化合物,其分子式是C<sub>15</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>13</sub>,为白色粉末,熔点183℃~185℃,微溶于水,易溶于甲醇、乙醇、氯仿等有机溶剂。当排斥反应发生时,刺激细胞增生的信号通过IL-2受体或生长因子受体激活磷脂酰肌醇3激酶(PI<sub>3</sub>K)链,导致蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)活化。PKB直接激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)<sup>[14]</sup>,从而促进T细胞及其他细胞的增生。mTOR是一种多功能激酶,同有丝分裂原的刺激、蛋白合成、细胞周期进程有关,在淋巴细胞的共刺激活化和细胞周期过程中均存在<sup>[15]</sup>,mTOR的突变可对RAPA产生耐受。RAPA结合在亲免疫蛋白2FK506结合蛋白(FK506 binding protein, FKBP)上,形成RAPA-FKBP-12复合物,抑制mTOR的丝氨酸/苏氨酸激酶的活性,阻断T淋巴细胞及其他细胞由G<sub>1</sub>期至S期的增生进程,也就对DTH产生抑制作用。

由于雷帕霉素为脂溶性药物,常规局部给药不能良好穿透眼表泪膜屏障,全身使用极易带来不良反应<sup>[16]</sup>,因此本课题组使用3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸共聚物(PHBV)作为雷帕霉素的载体,采用乳化-溶剂挥发(O/W)法制备成具有缓释性的雷帕霉素微球,在体外释放实验

中,较原药组明显提高药物释放百分比,500h体外释药率为71%<sup>[6]</sup>。本实验将制作的雷帕霉素缓释微球结膜下注射于NOD小鼠,能够直接作用于NOD小鼠SS性干眼,其中200μg/kg和400μg/kg的实验组小鼠与生理盐水和空白微球对照组小鼠比较,泪液分泌量明显增加,角膜荧光素染色和角结膜虎红染色评分降低,结膜印记细胞学等级降低,达到了有效的药物浓度。其为临床上继续研究用药安全、减少用药次数、提高药物利用率奠定了良好的基础,为临床SS性干眼的治疗提供了依据。

### 参考文献

- Smith JA. The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf* 2007;5(2):93-107
- Lemp MA, Baudouin C, Baum J, et al. The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop(2007). *Ocul Surf* 2007;5(2):75-92
- 董怡. 干燥综合征诊治指南. 中华风湿病学杂志 2003;7(7):446-448
- Chang JY, Selgal SN. Plaramacology of rapamycin: a new immunosuppressive agent. *Br J Rheumatol* 1991;30(2):62-65
- Kitagawa H, Hotta Y, Fujiki K, et al. Cloning and high expression of rabbit FKBP25 in cornea. *Jpn J Ophthalmol* 1996;40(2):133-141
- 王莎莎, 刘焰, 胡道德. 球结膜下注射用西罗莫司缓释微球的制备及体外释药性能. 中国新药与临床杂志 2012;31(6):312-317
- Nakamura S, Shibuya M, Nakashima H, et al. D-β-hydroxybutyrate protects against corneal epithelial disorders in a rat dry eye model with jogging board. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(7):2379-2387
- Van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969;82(1):10-14
- Nelson JD. Impression cytology. *Cornea* 1988;7(1):71
- Yanagi K, Ishimaru N, Haneji N, et al. Anti-120-Kdaα-fodrin immune response with Th1-cytokine profile in the NOD mouse model of Sjogren's syndrome. *Eur J Immunol* 1998;28(10):3336-3345
- 陈海英, 果占国. 干燥综合征动物模型的研究与应用现状. 中华风湿病学杂志 2004;8(8):493-496
- Tomwall J, Lane TE, Fox RI, et al. T cell attractant chemokine expression initiates lacrimal gland destruction in nonobese diabetic mouse. *Lab Invest* 1999;79(12):1719-1726
- 朱健, 谢祥茂, 陈俊勇. 他克莫司产生菌的选育和生产工艺研究. 中国医药工业杂志 2005;36(4):207-210
- Mourad G, Vela C, Ribstein J, et al. Long-term improvement in renal function after cyclosporine reduction in renal transplant recipients with histologically proven chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation* 1998;65(5):661-667
- Gronyo JM. Progress with cyclosporine-sparing regimens. *Transplant Proc* 1999;31(8A):11S-16S
- Marti HP, Frey FJ. Nephrotoxicity of rapamycin: an emerging problem in clinical medicine. *Nephrol Dialysis Transplant* 2005;20(1):13-15