

玻璃体腔注射塞来昔布抑制大鼠视网膜新生血管的作用

李 鹏¹, 任 兵², 高晓唯², 蔡 岩², 鞠 燕², 伊 娜²

作者单位:¹(832003)中国新疆维吾尔自治区石河子市,石河子大学医学院;²(830013)中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,解放军第474医院 全军眼科中心

作者简介:李鹏,在读硕士研究生,研究方向:眼底病及眼肌学。

通讯作者:任兵,教授,硕士研究生导师,眼科主任,研究方向:眼底病及眼肌学. rb5954391@163.com

收稿日期:2016-09-23 修回日期:2017-03-13

Effect of intravitreal injection of celecoxib on neovascularization in rats

Peng Li¹, Bing Ren², Xiao-Wei Gao², Yan Cai², Yan Ju², Na Yi²

¹Department of Ophthalmology, the Medical College of Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Department of Ophthalmology, Ophthalmic Center of PLA, No. 474 Hospital of Chinese PLA, Urumqi 830013, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Bing Ren. Department of Ophthalmology, Ophthalmic Center of PLA, No. 474 Hospital of Chinese PLA, Urumqi 830013, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. rb5954391@163.com

Received:2016-09-23 Accepted:2017-03-13

Abstract

• **AIM:** Through intravitreal injection of celecoxib in oxygen-induced retinopathy (OIR) rat model, to investigate the effect and mechanism of celecoxib on neovascularization of OIR.

• **METHODS:** Ninety-six 7-day-old SD rats were randomly divided into 6 groups: Group Z: Normal group; Group O: OIR; Group A: OIR + vehicle control group; Group B: OIR + 5 μ g celecoxib group; group C: OIR + 20 μ g celecoxib group; group D: OIR + 80 μ g celecoxib group. In addition to Z group in the normal environment, the other groups were established the OIR model. The neonatal rats were given intravitreal injections of dimethyl sulfoxide (DMSO) and the corresponding doses of celecoxib on the 12th day after birth. The rats were sacrificed on day 17 after birth. HE staining were employed to count the vascular endothelial cells which were breakthrough within the internal limiting membrane of retina. Immunohistochemistry staining were utilized to probe the expression of VEGF protein.

• **RESULTS:** HE staining showed that, the number of the endothelial cells in the retina was 0.44 ± 0.18 , 30.60 ± 5.36 , 28.05 ± 4.68 , 19.58 ± 4.58 , 10.13 ± 1.93 , 7.58 ± 2.68 in Group Z, O, A, B, C and D. In addition to Group O and Group

A, there were significant differences between the two groups ($P < 0.05$). After treatment with celecoxib, breakthrough of the internal limiting membrane of the vascular endothelial cell nucleus was significantly reduced, and positively correlated with the dose. Immunohistochemical results showed, the expression of VEGF protein in Group Z was negative, the expression rate was 10%, the positive expression of VEGF protein in Group A was higher than that in Group B, C and D, and the positive rate was 86%, which was higher than that of Group B, C and D, as 68%, 42%, 30%.

• **CONCLUSION:** Celecoxib can inhibit the OIR model of rat retinal angiogenesis, and the effect of suppressing a positive correlation with the dose, its action may inhibit VEGF expression.

• **KEYWORDS:** celecoxib; oxygen-induced retinopathy; neovascularization; cyclooxygenase-2

Citation: Li P, Ren B, Gao XW, et al. Effect of intravitreal injection of celecoxib on neovascularization in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(4):635-638

摘要

目的:通过对大鼠氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)模型进行玻璃体腔注射塞来昔布,探讨塞来昔布在OIR中对视网膜新生血管的作用及其机制。

方法:选取7天龄SD乳鼠96只随机分为6组:Z组:正常组;O组:OIR组;A组:OIR+溶媒对照组;B组:OIR+塞来昔布5 μ g组;C组:OIR+塞来昔布20 μ g组;D组:OIR+塞来昔布80 μ g组。除Z组在正常环境饲养外,其余各组乳鼠均建立OIR模型。乳鼠于生后第12d出氧箱后给予玻璃体内注射二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)及相应剂量的塞来昔布,于生后第17d处死,做组织切片HE染色观察视网膜组织形态并计数突破内界膜的血管内皮细胞核数,石蜡切片行免疫组化染色检测VEGF蛋白的表达。

结果:HE染色显示,Z组、O组、A组、B组、C组、D组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数分别为 0.44 ± 0.18 , 30.60 ± 5.36 , 28.05 ± 4.68 , 19.58 ± 4.58 , 10.13 ± 1.93 , 7.58 ± 2.68 个;除O组与A组外,各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),经塞来昔布治疗后,突破内界膜的血管内皮细胞核明显减少,且与剂量正相关;免疫组化结果显示,Z组VEGF蛋白表达呈阴性,表达率为10%,其余各组可见VEGF蛋白的阳性表达,O、A组阳性表达较高,阳性率分别为90%、86%,表现为棕褐色颗粒或团块,均高于B、C、D组,且三组的阳性表达依次减低为68%、42%、30%。

结论:塞来昔布能够有效抑制大鼠OIR模型视网膜新生

血管的生长,且抑制效果与剂量正相关,其作用可能通过抑制 VEGF 表达实现。

关键词:塞来昔布;氧诱导视网膜病变;新生血管;环氧化酶-2

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.4.11

引用:李鹏,任兵,高晓唯,等.玻璃体腔注射塞来昔布抑制大鼠视网膜新生血管的作用.国际眼科杂志 2017;17(4):635-638

0 引言

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)的发病率呈上升趋势,且随着世界医疗水平和围生医学的不断提升,早产儿存活率特别是低体重、极低体重儿甚至是超低出生体重儿的存活率明显增高,目前已成为世界儿童致盲的主要原因,在发展中国家尤为明显^[1-2]。塞来昔布是一种特异性的环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂,具有胃肠道、血小板及肾功能等毒副作用小的优点,在临床上用于治疗类风湿关节炎、骨关节炎及家族性腺瘤息肉等疾病,在抑制新生血管病变方面有研究报道^[3-4]。本实验通过选择氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)的大鼠模型^[5],模型中视网膜血管病理改变与ROP的病理过程极度吻合,首次对其玻璃体腔内注射不同剂量的塞来昔布,进而观察塞来昔布对视网膜新生血管的抑制作用及其机制,为ROP的治疗提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取7天龄健康SD大鼠96只(新疆医科大学动物中心提供,SPF级),体质量15g左右,性别不限,与哺乳母鼠共同饲养,所有动物均具有动物检疫合格证,符合无眼部疾患的原则。实验动物及饲养条件符合国家科学技术委员会规定的《实验动物管理条例》规则。

1.1.2 主要试剂和仪器 塞来昔布原料(湖北兴银河化工公司,湖北武汉),VEGF(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,中国),兔二步法试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),数字测氧仪(杭州建德分析仪器二厂,中国),微量进样器(hamilton,美国),光学显微镜(Olympus,日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 7天龄SD大鼠96只按随机原则分为6组,每组16只,分别为:Z组:正常组;O组:OIR组;A组:OIR+溶媒对照组;B组:OIR+塞来昔布5 μ g组;C组:OIR+塞来昔布20 μ g组;D组:OIR+塞来昔布80 μ g组。除Z组在正常环境饲养外,其余各组乳鼠均建立OIR模型。

1.2.2 OIR模型的建立 将鼠龄7d的SD乳鼠与哺乳母鼠一起放置于密闭的玻璃箱内,容器内接入医用纯氧气,氧气的流量控制0.75L/min左右,使容器内氧分压保持在75% \pm 2%,确保氧浓度的恒定,每日测量6次。每天打开玻璃箱更换鼠垫料、加食、换水及更换哺乳母鼠,控制时间在10min以内。高氧环境下饲养至12d,玻璃体腔注射不同剂量药物,然后放置正常环境中饲养到17d,处死。

1.2.3 给药方法 将塞来昔布粉剂分别溶于二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)中,配制成不同浓度的塞来昔布液:1、4、16 μ g/ μ L。A、B、C、D组于生后第12d经腹腔注射10%水合氯醛(每10g 0.03mL)麻醉,复方托吡卡胺

散瞳双眼,氯霉素眼液术前滴眼、冲洗眼睛,距角巩膜缘1mm处垂直进针,玻璃体内分别注射5 μ L的DMSO溶液及1、4、16 μ g/ μ L的塞来昔布溶液各5 μ L。术后每日3次氧氟沙星眼液点眼。

1.2.4 HE染色 至生后第17d时,各组随机取8只乳鼠经10%水合氯醛腹腔注射过量麻醉至死,然后迅速取下双眼眼球置于40g/L多聚甲醛中固定50min,手术显微镜下去除眼前节及部分眼内容物(保留视网膜的完整性),置于40g/L多聚甲醛中固定24h后常规脱水,石蜡包埋,平行于角膜至视盘矢状位的平面连续切片,贴片,厚度5 μ m,每个平面间隔30 μ m,每只眼球选4张切片用于检查。每组各随机抽取16张切片行HE染色,在显微镜下计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目(计数时仅计数与内界膜有联系的血管内皮细胞核数)。

1.2.5 视网膜组织免疫组化染色 各组随机选取切片行免疫组化染色用于检测VEGF的表达,60 $^{\circ}$ C烤箱中烤片;脱蜡复水;3mL/L H₂O₂灭活过氧化物酶;抗原修复;山羊血清封闭,倾去勿洗;滴加抗体VEGF(1:100稀释),4 $^{\circ}$ C过夜;37 $^{\circ}$ C复温;二抗孵育(37 $^{\circ}$ C, 30min);DAB显色,显微镜下观察;苏木素复染;1%盐酸乙醇分色;返蓝;脱水透明封化;显微镜下观察并采集图像。切片中观察VEGF阳性表达为细胞浆棕黄色染色,每组在高倍镜下随机选取50个高倍视野,根据细胞染色深度及阳性细胞结果为标准,阳性细胞数小于25%为阴性;25%~50%为弱阳性;50%~75%为阳性;大于75%为强阳性,按照此标准统计其阳性率。

统计学分析:采用SPSS19.0统计学软件进行统计学处理,采用均数 \pm 标准差表示,突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目采用多样本均数比较的方差分析;两两组间比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组视网膜HE染色情况 Z组:无或极少有血管内皮细胞突破视网膜内界膜,细胞排列规则;O组:视网膜可以看到大量血管内皮突破视网膜内界膜,形成管腔,各层组织结构排列紊乱;A组:大量血管内皮细胞突破视网膜内界膜,部分形成管腔,细胞排列紊乱;B组:突破内界膜的细胞核稍减少,但仍有部分形成管腔;C组:突破内界膜的血管内皮细胞明显减少且无新生血管管腔形成;D组:少量血管内皮细胞突破内界膜,细胞排列规则。

2.2 各组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目 Z组、O组、A组、B组、C组、D组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数分别为0.44 \pm 0.18、30.60 \pm 5.36、28.05 \pm 4.68、19.58 \pm 4.58、10.13 \pm 1.93、7.58 \pm 2.68个,经统计学处理分析,各组间差异有统计学意义($F = 167.07, P < 0.01$);进一步两两比较,除O组与A组间差异无统计学意义($P = 0.19$),其余各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$,图1)。

2.3 各组免疫组织化学VEGF蛋白检测结果 Z组VEGF蛋白表达呈阴性,表达率为10%,O组、A组视网膜各层组织结构紊乱,可见大量VEGF表达,呈棕黄色,阳性表达率为90%、86%。B组、C组、D组与A组相比,VEGF阳性表达降低,且染色区域及深度减少,且阳性表达率依次为68%、42%、30%(图2)。

3 讨论

塞来昔布是一种特异性的环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂。有研究表明,塞来

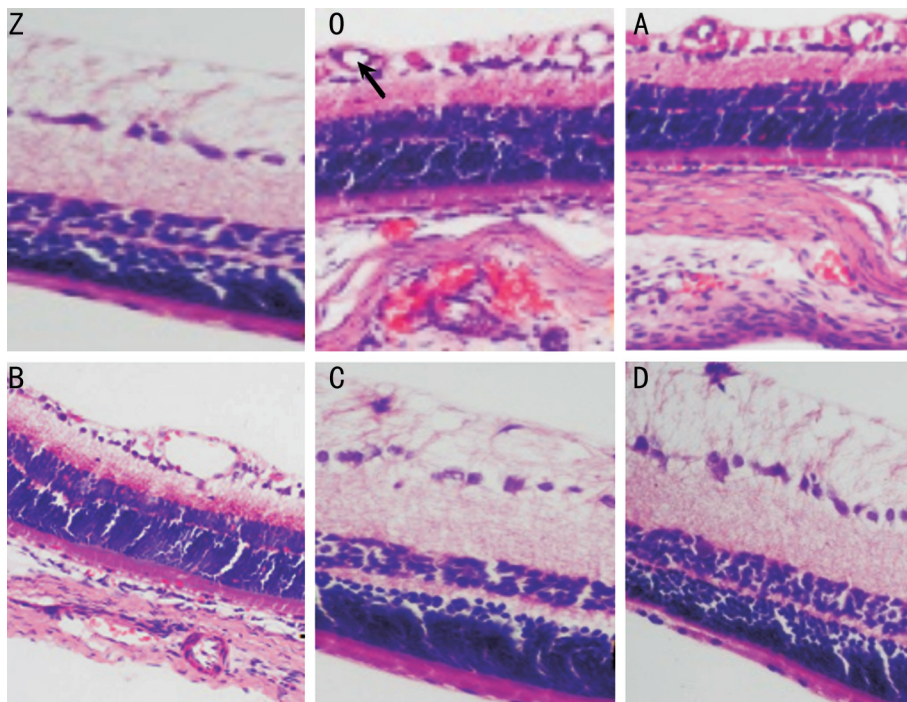


图1 各组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目 (HEX200) Z:正常组;O:OIR组(箭头所示 OIR组血管内皮细胞突破视网膜内界膜形成的管腔);A:OIR+溶媒对照组;B:OIR+塞来昔布 5 μ g组;C:OIR+塞来昔布 20 μ g组;D:OIR+塞来昔布 80 μ g组。

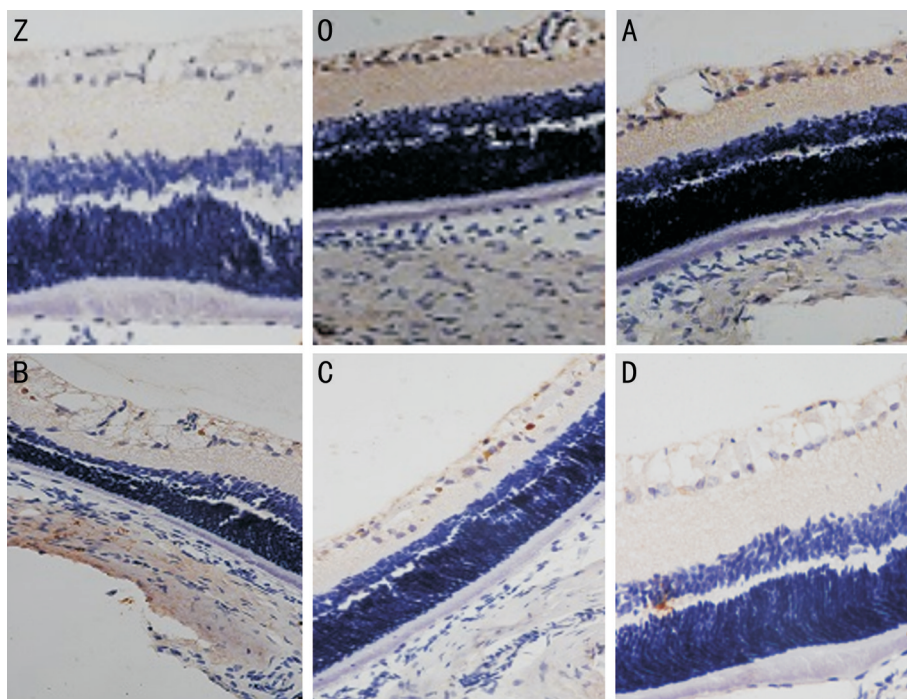


图2 各组免疫组织化学 VEGF 检测结果 (X400) Z:正常组;O:OIR组 A:OIR+溶媒对照组;B:OIR+塞来昔布 5 μ g组;C:OIR+塞来昔布 20 μ g组;D:OIR+塞来昔布 80 μ g组。

昔布对部分肿瘤细胞有抑制生长的作用,如肺癌^[6-7]、结肠癌^[8-9]及肝癌^[10-11]等肿瘤,在其组织标本中 COX-2 及 VEGF 表达均升高,且都与新生血管数量呈正相关,但应用塞来昔布后,组织中 COX-2 及 VEGF 表达均降低,新生血管数量减少,所以其作用与其抑制 VEGF 的表达进而抑制其新生血管生成有关。

近些年来,塞来昔布在眼科动物模型中抑制新生血管疾病方面也有研究报道。Dong^[12-13]研究认为塞来昔布能抑制大鼠角膜新生血管生长,可抑制 COX-2 和 VEGF 的

表达;Nassiri 等^[14]研究发现,塞来昔布可降低糖尿病小鼠模型的眼部视网膜新生血管的生长,其眼内 VEGF 表达下降;Hao 等^[15]实验结果表明,塞来昔布可抑制脉络膜新生血管的生长,通过调控 COX-2 的表达进而降低 VEGF 的表达水平,以上结果发现塞来昔布能够抑制眼部新生血管的增生,其作用机制通过调控 VEGF 表达进而抑制新生血管的生长。本实验选择建立 OIR 模型,对模型进行玻璃体腔注射塞来昔布,探讨塞来昔布在 OIR 模型中对视网膜新生血管的抑制作用及其机制。本实验玻璃体腔注射

塞来昔布的药物浓度参考以往实验中运用玻璃体腔注射塞来昔布的剂量,在此基础上进行探讨^[16]。通过本实验发现,塞来昔布能够有效地抑制大鼠 OIR 模型中视网膜新生血管的生长。HE 染色证实高氧下的大鼠视网膜界面毛糙,突破视网膜内界膜的内皮细胞核增多,形成管腔,其内可见散落红细胞,视网膜各层排列紊乱,经玻璃体内注射 3 个浓度梯度的塞来昔布之后,视网膜新生血管不同程度减轻,组织结构紊乱程度降低,突破内界膜的内皮细胞核数目减少,且突破内界膜的内皮细胞核数进行统计学分析,说明各组之间有统计学差异,注射塞来昔布的浓度越高新生血管受到抑制程度越大,视网膜组织结构恢复越好,说明抑制效果呈剂量正相关;免疫组化同时证实暴露于高氧的大鼠视网膜 VEGF 呈强阳性表达,经过玻璃体腔注射 3 个浓度梯度的塞来昔布后 VEGF 表达依次减弱,并且浓度越高抑制效果越明显,说明塞来昔布通过抑制 VEGF 的表达进而抑制视网膜新生血管的生长。

目前在国内,首次应用塞来昔布于 OIR 模型中抑制视网膜新生血管的生长,通过 HE 染色可以较为直观地观察视网膜新生血管生长的具体情况,免疫组化证实抑制视网膜新生血管的部分机制,为进一步研究探讨 ROP 的治疗提供理论依据,但如何调节 VEGF 的表达和是否具有统计学意义,还需要进一步研究。Yan 等^[17]研究认为,玻璃体腔注射 DMSO 溶解的塞来昔布剂量在 3mg 以下是安全无毒的,无明显的药物不良反应,且药物作用持续时间长,可以减少眼内注射的次数。本实验采用玻璃体内注射的这种局部给药方法,具有操作简单、易于推广且缩短到达有效药物浓度时间的优点,与全身用药相比可以减少用药的剂量、血液中药物的浓度及减轻药物的毒副作用。总之,本实验研究结果表明,塞来昔布有抑制眼部视网膜新生血管增生的作用,给眼部患有新生血管性疾病患者带来新的治疗希望。

参考文献

- 1 Zin A, Gole GA. Retinopathy of prematurity - incidence today. *Clin Perinatol* 2013;40(2):185-200
- 2 Kong L, Fry M, Al-Samarraie M, et al. An update on progress and the changing epidemiology of causes of childhood blindness worldwide. *J Am Assoc Pediatric Ophthalmol Strabismus* 2012;16(6):501-507
- 3 Yao SN, Chang XU, Zhang QQ, et al. Development in the synthesis, pharmacology, clinical applications of celecoxib. *Guide China Med* 2013;28:51-55

- 4 Symeonidis N, Papakonstantinou E, Psarras K, et al. The effect of celecoxib administration on the healing and neovascularization of colonic anastomosis in rats. *Surg Res* 2014;27(3):139-146
- 5 Kim CB, D'Amore PA, Connor KM. Revisiting the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Eye Brain* 2016;8(1):67-79
- 6 Li YX, Wang JL, Gao M, et al. Celecoxib-erlotinib combination delays growth and inhibits angiogenesis in EGFR-mutated lung cancer. *Am J Cancer Res* 2016;6(7):1494-1510
- 7 Sörenson S, Fohlin H, Lindgren A, et al. Predictive role of plasma vascular endothelial growth factor for the effect of celecoxib in advanced non-small cell lung cancer treated with chemotherapy. *Eur J Cancer* 2013;49(1):115-120
- 8 Chae SW, Sohn JH, Kim EJ, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and tumor microvessel density in colorectal cancer. *Cancer Res Treatment* 2015;35(5):400-406
- 9 Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001;121(6):1339-1347
- 10 Guo LY, Zhu P, Jin XP. Association between the expression of HIF-1 α and VEGF and prognostic implications in primary liver cancer. *Genetics Mol Res Gmr* 2016;15(2):1-9
- 11 Wang LJ, Bai L. Expressions and relationship between COX-2, VEGF and NF- κ B in hepatocellular carcinoma tissues. *China J Cancer Prevent Treatment* 2011;18(9):693-696
- 12 Dong Y. Effect of COX-2 and its inhibitor Celecoxib on corneal neovascularization. *Chin Ophthalmic Res* 2007;25(6):424-427
- 13 Dong Y. COX-2 and its inhibitor Celecoxib in corneal neovascularization. *Int J Ophthalmol* 2006;6(3):523-526
- 14 Nassiri S, Houshmand G, Fegghi M, et al. Effect of periocular injection of celecoxib and propranolol on ocular level of vascular endothelial growth factor in a diabetic mouse model. *Int J Ophthalmol* 2016;9(6):821-824
- 15 Hao YH, Jin LI, Diao X. Inhibition effect of celecoxib on the experimental choroidal neovascularization. *Chinese J Ocular Fundus Disease* 2010;26(1):32-36
- 16 Kim SJ, Hassanain T, Rohan S, et al. The safety, pharmacokinetics, and efficacy of intraocular celecoxib. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(3):1409-1418
- 17 Yan C, Wang Y, Xu J, et al. Inhibiting effect of celecoxib intravitreal injection on choroidal neovascularization in a rat model. *Chin Ophthalmic Res* 2009;27(11):945-949