

# 丝裂霉素纳米粒抑制青光眼滤过术后瘢痕增殖的安全性和疗效

李盈<sup>1,2</sup>, 唐娟<sup>2,3</sup>, 李长芬<sup>4</sup>, 方其林<sup>1,2</sup>, 刘兴德<sup>1,2</sup>, 张丹<sup>1,2</sup>, 张婷婷<sup>1,2</sup>, 吴小利<sup>1,2</sup>,  
李涛<sup>1,2</sup>

引用:李盈,唐娟,李长芬,等. 丝裂霉素纳米粒抑制青光眼滤过术后瘢痕增殖的安全性和疗效. 国际眼科杂志, 2024, 24(11): 1708-1714.

基金项目:四川省资阳市医学科学课题计划项目(No. KY2023001, KY2023023);四川省资阳市科学技术局计划项目(No. zykjssc20-yyjc-2023-04);2024年度河北省医学科学课题计划(No. 20240294);四川省老年医学学会研究课题(No. 24SCLN0115)

作者单位:(641300)中国四川省资阳市中心医院<sup>1</sup>眼科;<sup>2</sup>眼科重点实验室;<sup>3</sup>内分泌科;<sup>4</sup>病理科

作者简介:李盈,硕士研究生,主治医师,研究方向:纳米药物。

通讯作者:李涛,博士研究生,主治医师,研究方向:纳米药物。1138583262@qq.com

收稿日期:2024-04-03 修回日期:2024-09-27

## 摘要

目的:制备一种以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体,丝裂霉素C(MMC)搭载于PLGA的纳米药物MMC-ATS-@PLGA,并从体内实验角度分析该纳米药物对于青光眼术后抑制滤过泡瘢痕增殖的生物安全性和治疗效果。

方法:采用薄膜分散-水化超声法制备纳米药物MMC-ATS-@PLGA,并检测其物理和化学性质。通过角膜荧光染色和HE染色分析MMC-ATS-@PLGA对兔眼角膜的影响,并进一步收集兔眼泪膜破裂时间(BUT)、Schirmer试验、眼压等数据分析眼表生物安全性。通过裂隙灯观察并计算滤过泡大小和结膜HE染色分析组织形态学变化,并通过免疫组化和Elisa实验多角度基于蛋白组学对比分析氟米龙滴眼液(FML)、MMC和MMC-ATS-@PLGA纳米粒抑制青光眼术后滤过泡瘢痕效果。

结果:MMC-ATS-@PLGA平均粒径和电位为 $128.78 \pm 2.54$  nm和 $36.49 \pm 4.25$  mV,其包封率和载药率分别为 $(78.49 \pm 2.75)\%$ 和 $(30.86 \pm 1.84)\%$ ;在 $33^\circ\text{C}$ (眼表温度)条件下,MMC-ATS-@PLGA纳米粒在600 min时累计释放率可达 $(76.58 \pm 2.68)\%$ 。同时角膜荧光染色、HE、BUT、Schirmer和眼压结果显示,MMC-ATS-@PLGA对于兔眼表生物安全性良好。术后3 wk,结果显示MMC-ATS-@PLGA组滤过泡的面积明显大于FML组和MMC组,控制组滤过泡基本消失;进一步提取兔眼滤过泡区域的结膜进行病理组织分析,MMC-ATS-@PLGA组胶原纤维形态相对规则,排列整齐,组织形态基本接近正常组。并且Elisa实验结果表明,与正常组相比,控制组中 $\alpha$ -SMA、CTGF和Ⅲ型胶原纤维抗体的表达水平显著增高,予以FML、MMC和MMC-ATS-@PLGA治疗3 wk后,炎症因子表达逐渐

下降,其中MMC-ATS-@PLGA组炎症因子表达下降最明显( $P < 0.05$ )。

结论:本研究成功合成一种针对青光眼滤过术后抑制滤过泡瘢痕增殖的纳米药物(MMC-ATS-@PLGA),其具有稳定的物理化学性质、良好的生物相容性和更佳的抗炎效果,其通过抑制炎症因子 $\alpha$ -SMA、CTGF和Ⅲ型胶原纤维的表达,阻止滤过泡区瘢痕化形成,从而提高青光眼滤过手术的成功率。

关键词:青光眼滤过术;丝裂霉素C;纳米医学;抗炎效果

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.11.04

## Safety and efficacy of mitomycin nanoparticles in inhibiting scar proliferation after glaucoma filtration surgery

Li Ying<sup>1,2</sup>, Tang Juan<sup>2,3</sup>, Li Changfen<sup>4</sup>, Fang Qilin<sup>1,2</sup>, Liu Xingde<sup>1,2</sup>, Zhang Dan<sup>1,2</sup>, Zhang Tingting<sup>1,2</sup>, Wu Xiaoli<sup>1,2</sup>, Li Tao<sup>1,2</sup>

Foundation items: The Ziyang City Medical Science Project (No. KY2023001, KY2023023); Ziyang Science and Technology Bureau Project (No. zykjssc20-yyjc-2023-04); 2024 Hebei Province Medical Science Research Plan Project (No. 20240294); Sichuan Geriatrics Society Fund Projects (No.24SCLN0115)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology; <sup>2</sup>Ziyang Key Laboratory of Ophthalmology; <sup>3</sup>Department of Endocrinology; <sup>4</sup>Department of Pathology, Zi Yang Central Hospital, Ziyang 641300, Sichuan Province, China

Correspondence to: Li Tao. Department of Ophthalmology; Ziyang Key Laboratory of Ophthalmology, Zi Yang Central Hospital, Ziyang 641300, Sichuan Province, China. 1138583262@qq.com

Received:2024-04-03 Accepted:2024-09-27

## Abstract

• AIM: To prepare a nanodrug MMC-ATS-@PLGA using polylactic acid hydroxyacetic acid copolymer (PLGA) as a carrier and mitomycin C (MMC) loaded on PLGA, and to analyse the biological safety and treatment effect of this nanodrug on inhibiting the proliferation of filtering bleb scarring after glaucoma surgery *in vivo*.

• METHODS: The thin-film dispersion hydration ultrasonic method was used to prepare the MMC-ATS-@PLGA, and its physical and chemical properties were detected. The effect of MMC-ATS-@PLGA on rabbit

corneas was analysed through corneal fluorescence staining and HE staining, and tear film rupture time (BUT), Schirmer test and intraocular pressure data were collected to analyse ocular surface biosafety. A slit lamp was used to observe and calculate the filtration bubble size, and the tissue morphological changes were analysed by conjunctival HE staining. In addition, immunohistochemistry and Elisa were used to compare the anti-inflammatory effects of Flumionone Eye Drops (FML), MMC, and MMC-ATS-@PLGA nanoparticles on inhibiting the formation of filtering bleb scarring after glaucoma surgery from multiple perspectives *via* comparative proteomic analysis.

• **RESULTS:** The average particle size and zeta potential of MMC-ATS-@PLGA were  $128.78 \pm 2.54$  nm and  $36.49 \pm 4.25$  mV, respectively, with an encapsulation efficiency and a drug loading rate of  $(78.49 \pm 2.75)\%$  and  $(30.86 \pm 1.84)\%$ , respectively. At  $33^\circ\text{C}$  (the ocular surface temperature), the cumulative release rate of the MMC-ATS-@PLGA nanoparticles reached  $(76.58 \pm 2.68)\%$  after 600 min. Moreover, corneal fluorescence staining, HE, BUT, Schirmer, and intraocular pressure results showed that MMC-ATS-@PLGA had good biocompatibility with the ocular surface of rabbits. At 3 wk after surgery, the area of filtering blebs in the MMC-ATS-@PLGA group was significantly larger than that in the FML group and MMC group, and the filtering blebs in the control group had basically disappeared. Pathological tissue analysis of the conjunctiva in the filtering blebs area of the eyes of the rabbits revealed that compared with that in the normal group, the morphology of the collagen fibres in the MMC-ATS-@PLGA group was relatively regular, the fibres were arranged neatly, and the tissue morphology was similar to that of the normal group. Immunohistochemistry and Elisa confirmed that compared with those in the normal group, the expression levels of  $\alpha$ -SMA, CTGF, and type III collagen fibre antibodies were significantly increased in the control group. After FML, MMC, or MMC-ATS-@PLGA treatment for 3 wk, the expression of inflammatory factors gradually decreased. Among the groups, the MMC-ATS-@PLGA group showed the most significant decrease ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** This study successfully synthesized a nanomedicine (MMC-ATS-@PLGA) that inhibits scar proliferation after glaucoma filtration surgery. The drug had stable physicochemical properties, good biocompatibility, and better anti-inflammatory effects by inhibiting the expression of  $\alpha$ -SMA, CTGF, and type III collagen fibres, which can prevent the formation of scarring in the filtering blebs area, thereby improving the success rate of glaucoma filtering surgery.

• **KEYWORDS:** glaucoma filtration surgery; mitomycin C; nanomedicine; anti-inflammatory effect

**Citation:** Li Y, Tang J, Li CF, et al. Safety and efficacy of mitomycin nanoparticles in inhibiting scar proliferation after glaucoma filtration surgery. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024, 24(11):1708-1714.

## 0 引言

青光眼已成为全球范围内不可逆致盲眼病的首位原因<sup>[1-2]</sup>,至2040年,预计发病人数达约1.1亿万人,亚洲占比60%,由于视力和视野的储备代偿作用,患者出现明显症状时往往到了中晚期,治疗效果和预后都不容乐观<sup>[3-4]</sup>。研究表明青光眼滤过术自1968年应用于临床,目前仍然是治疗青光眼的主要手术方式,而滤过泡的形成对于青光眼手术治疗效果评估非常重要,是临床上最直观的体征,即手术能否成功关键在于术后能否形成有功能的滤过泡,然而,由于手术对结膜和巩膜组织的创伤较大,往往刺激手术区受损的结膜和巩膜组织成纤维细胞增殖、活化转变为肌成纤维细胞向伤口处移行,并释放炎症因子 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin, $\alpha$ -SMA)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)、III胶原纤维等强表达,从而促使滤过泡的瘢痕形成,滤道被阻塞是导致手术失败的主要原因<sup>[5-7]</sup>。研究表明一些抗瘢痕形成药物,如皮质类固醇、抗代谢药物、胶原交联抑制剂、抗凝血药物和前列腺素抑制剂等已用于青光眼滤过术的实验及临床研究,且取得一定临床效果<sup>[8-9]</sup>。特别是丝裂霉素C(mitomycin C,MMC)应用于青光眼滤过术后,其良好的抗瘢痕增殖作用,可以有效抑制滤过泡瘢痕化,从而明显的提高了青光眼术后的成功率<sup>[10-11]</sup>。但由于MMC易引起伤口渗漏、浅前房、低眼压、眼内炎等术后并发症,目前临床使用受限<sup>[12]</sup>。随着纳米医学在临床和科研方面研究的深入,研究表明聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly-lactic acid hydroxyacetic acid copolymer,PLGA)具有良好的生物相容性和缓释性等特点,目前已经应用于眼科结膜炎、干眼和角膜炎等方面的研究<sup>[13-14]</sup>。因此,本研究拟将PLGA作为纳米载体,结合MMC合成纳米药物MMC-ATS-@PLGA,拟利用纳米技术降低MMC的药物毒副作用,提高药物在青光眼术后抑制滤过泡瘢痕形成的药物效果。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选用MMC作为试验药物,以PLGA和玻璃酸钠(sodium hyaluronate eye drops,ATS)为包封材料制备MMC-ATS-@PLGA。重庆医科大学动物实验中心获得80只雄性健康新西兰大白兔(2.0-2.5 kg,14-16周龄),实验筛查标准:患有先天性青光眼、白内障、角膜炎、临床或亚临床圆锥角膜、角膜厚度 $<480\ \mu\text{m}$ 等眼部病变或疾病的新西兰大白兔被排除在研究之外。所有动物实验均经通过重庆医科大学科学技术伦理委员会批准,并符合ARVO关于动物在眼科和视觉研究中的声明标准,并且所有动物实验程序均符合实验动物保护原则。

## 1.2 方法

**1.2.1 主要试剂和仪器** 主要试剂和生产厂家分别为PLGA(上海麦克林生化科技有限公司,中国);甲醇(重庆川东化工集团,中国);PBS(pH=7.5)缓冲液;MMC(西安山川生物科技有限公司,中国)。主要仪器:旋转蒸发仪(上海泰坦生物有限公司,中国);声震仪(Sonics,美国);低温高速离心机(Eppendorf,德国);透射电镜(TEM)(HiTachi,日本);Malvern3000SSA型激光粒径及电位测量仪(Malvern,美国);紫外分光光度计(Shimadzu,日本)。

**1.2.2 MMC-ATS-@PLGA的制备** 采用薄膜分散-水化超声法(film-dispersion and hydration-sonication method)制备MMC和PLGA的纳米粒(MMC-ATS-@PLGA)<sup>[15]</sup>。具

体步骤:精密称取 50 mg 的 PLGA, 10 mg MMC 及 5 mL 三氯甲烷放入 100 mL 圆底烧瓶中;将圆底烧瓶转移到旋转蒸发仪上(60 °C, 负压-0.2 kpa, 45 min), 得到白色的纳米粒, 采用 PBS 洗脱, 冷却, 用 100 W, 5 min(5 s/5 s, 开/关) 工作模式的声震仪将已形成的纳米粒均匀化, 最后用低温离心机(4 °C, 12 000 r/min) 进行纯化, 4 °C 低温避光保存, 备用。用同样的方法制备载@ PLGA。

**1.2.3 MMC-ATS-@ PLGA 物理化学性质检测** 采用马尔文粒径仪测量 MMC-ATS-@ PLGA 和@ PLGA 的粒径和 Zeta 电位。将 MMC-ATS-@ PLGA 和@ PLGA 悬液在室温环境下静置 1-7 d, 分别检测每天的粒径大小, 以评估其稳定性; 分别配置不同浓度的丝裂霉素甲醇溶液, 通过紫外分光光度计测量其吸收度, 根据最大吸光度值确定吸收峰, 并且计算各自的浓度-吸光度标准曲线。MMC 包封率 = 载药量/总投入量 × 100%; MMC 载药率 = 载药量/PLGA 总量 × 100%。同时采用高效液相色谱法测量 MMC-ATS-@ PLGA 在 4 °C (储存温度) 和 33 °C (眼表温度) 情况下的药物释放率。

**1.2.4 体内生物安全性检测** 选取新西兰大白兔右眼作为实验对象, 随机分为正常组、氟米龙滴眼液 (FML) 组、MMC 组和 MMC-ATS-@ PLGA 组, 每组 5 眼, 模拟临床用药, 每日 3 次(8:00、15:00、22:00) 分别予以 30 μL 0.1% 玻璃酸钠滴眼液、氟米龙滴眼液 (1 mg/mL)、MMC 溶液 (1 mg/mL)、MMC-ATS-@ PLGA (1 mg/mL), 3 wk 后予以角膜荧光染色, 观察并记录角膜荧光染色情况; 随后采用戊巴比妥钠 (3%, 1 mL/kg) 对模型兔实施耳源静脉麻醉, 观察并记录泪膜破裂时间 (tear film rupture time, BUT)、泪液分泌试验 (Schirmer) 和眼压 (IOP); 最后予以静脉注射大剂量戊巴比妥钠 (3%, 1 mL/kg) 处死动物, 取下角膜标本予以 HE 染色, 观察并分析角膜形态学变化。

**1.2.5 青光眼滤过术动物模型建立** 选取新西兰大白兔右眼作为实验对象, 予以经典青光眼小梁切除术, 随机将实验分为控制组 (control)、FML 组、MMC 组和 MMC-ATS-@ PLGA 组, 每组 5 眼, 模拟临床用药, 每日 3 次(8:00、15:00、22:00) 分别予以 30 μL 0.1% 玻璃酸钠滴眼液、氟米龙滴眼液 (1 mg/mL)、MMC 溶液 (1 mg/mL)、MMC-ATS-@ PLGA (1 mg/mL), 另设置未进行手术的新西兰大白兔右眼作为正常组, 术前各组兔眼动物模型的年龄、体质量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**1.2.6 MMC-ATS-@ PLGA 体内抗瘢痕效果评价** 予以药物治疗干预后, 采用裂隙灯显微镜观察并记录术后 1-3 wk 滤过泡的形态学变化, 并通过 AI 智能辅助计算系统, 统计分析不同时间点滤过泡大小; 术后第 3 wk 时, 采用高浓度 CO<sub>2</sub> 将兔处死, 取下滤过泡区结膜标本予以 HE 染色, 观察并分析结膜组织形态学变化; 同时予以滤过泡区结膜标本免疫组化实验, 根据国际多质控中心发布的《国际特设专家委员会建议: 诊断免疫组织化学阳性对照标准化》<sup>[16]</sup>, 检测并分析滤过泡形成相关的炎症因子 α-SMA、CTGF 和 III 型胶原纤维的表达情况; 最后, 提取滤过泡区结膜组织蛋白进行酶联免疫吸附实验 (Elisa 实验) 检测因子 α-SMA、CTGF 和 III 型胶原纤维的表达情况。

统计学分析: 应用统计软件 SPSS 20.0 进行分析, 对于服从正态分布的计量资料, 应首先采用单因素方差分析进行多组间的比较, 若存在差异进一步采用 LSD-t 检验进行组间的两两比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MMC-ATS-@ PLGA 纳米粒表征分析** MMC-ATS-@ PLGA 纳米粒表面粗糙 (图 1A), 马尔文粒径仪显示@ PLGA 和 MMC-ATS-@ PLGA 粒径在室温条件下长时间监测变化无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 1B), 物理性质稳定, 其中 MMC-ATS-@ PLGA 和@ PLGA 的平均粒径分别为  $128.78 \pm 2.54$ 、 $115.74 \pm 3.17$  nm。本研究进一步分析@ PLGA 和 MMC-ATS-@ PLGA 平均电位变化, 结果显示, 与@ PLGA ( $-67.28 \pm 6.84$ ) mV 相比, MMC-ATS-@ PLGA 纳米药物合成后, 药物表面形成正电荷, 其 Zeta 电位为  $36.49 \pm 4.25$  mV (图 1C、D); 研究采用紫外分光光度计计算药物包封率和载药率, 结果显示 MMC-ATS-@ PLGA 纳米粒的包封率为  $(78.49 \pm 2.75)\%$ , 载药率为  $(30.86 \pm 1.84)\%$  (图 1E); 药物释放实验方面, 研究表明, MMC-ATS-@ PLGA 纳米粒在 33 °C (眼表温度) 条件下, 600 min 累计率高达  $(76.58 \pm 2.68)\%$ , 但在 4 °C (储存温度) 条件下, 可以稳定存在, 释放率仅为  $(4.69 \pm 0.53)\%$  (图 1F)。

**2.2 MMC-ATS-@ PLGA 纳米粒眼表生物安全性评估** 在药物作用于眼表 3 wk 后, FML 组和 MMC 组角膜荧光染色呈现出不同程度的点片状着色, 但 MMC-ATS-@ PLGA 组角膜未见明显点状着色 (图 2A); 进一步提取角膜进行 HE 染色, 结果显示 FML 和 MMC 组呈现不同程度的角膜上皮明显变薄和细胞组织水肿, 但 MMC-ATS-@ PLGA 组角膜形态基本接近正常组 (图 2B)。各组间眼表 BUT、Schirmer、眼压差异具有统计学意义 ( $F = 178.35$ 、 $126.79$ 、 $154.86$ , 均  $P < 0.05$ ), 研究显示与正常组 BUT ( $15.48 \pm 0.79$  s) 相比, FML 组 ( $9.36 \pm 0.82$  s) 和 MMC 组 ( $7.83 \pm 0.57$  s) 呈现不同程度的下降趋势, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 但 MMC-ATS-@ PLGA 组 BUT ( $15.16 \pm 0.54$  s) 与正常组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 并且 Schirmer 试验呈现出与 BUT 相同的变化趋势。与正常组眼压 ( $14.27 \pm 0.79$  mmHg) 相比, FML 组 ( $20.72 \pm 1.43$  mmHg) 眼压明显升高 ( $P < 0.05$ ), MMC 组 ( $14.12 \pm 0.84$  mmHg) 和 MMC-ATS-@ PLGA 组 ( $14.46 \pm 0.85$  mmHg) 眼压与正常组比较差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 见图 2C-E。

**2.3 MMC-ATS-@ PLGA 纳米粒抑制滤过泡瘢痕形成的形态学分析** 术后第 1 d, 各组均未出现角膜缺损、前房渗出、滤过泡渗漏等并发症, 各组均形成功能型滤过泡, 形态无明显差异。术后 1 wk 与术后 1 d 比较, 控制组、FML 组、MMC 组和 MMC-ATS-@ PLGA 组滤过泡减少量分别为  $12.78 \pm 2.93$ 、 $10.43 \pm 2.58$ 、 $8.57 \pm 1.64$ 、 $7.03 \pm 1.45$  mm<sup>2</sup>, FML 组、MMC 组和 MMC-ATS-@ PLGA 组滤过泡隆起、弥散, 充血明显减轻; 随着时间的延长, 滤过泡逐渐变小、扁平。术后 3 wk 较术后 1 wk 比较, 控制组、FML 组、MMC 组和 MMC-ATS-@ PLGA 组滤过泡减少量分别为  $21.49 \pm 2.37$ 、 $14.85 \pm 2.27$ 、 $12.38 \pm 1.95$ 、 $9.46 \pm 1.73$  mm<sup>2</sup>; MMC-ATS-@ PLGA 组滤过泡的面积明显大于 FML 组和 MMC 组, 控制组滤过泡基本消失, 见图 3。术后 3 wk, 进一步提取兔眼滤过泡区域的结膜进行病理组织分析, 结果显示与正常组相比, MMC 组可见大量生成的胶原纤维, 且排列不规则, 胶原纤维致密且粗大, MMC-ATS-@ PLGA 组胶原纤维形态相对规则, 排列整齐, 组织形态基本接近正常组 (图 4)。

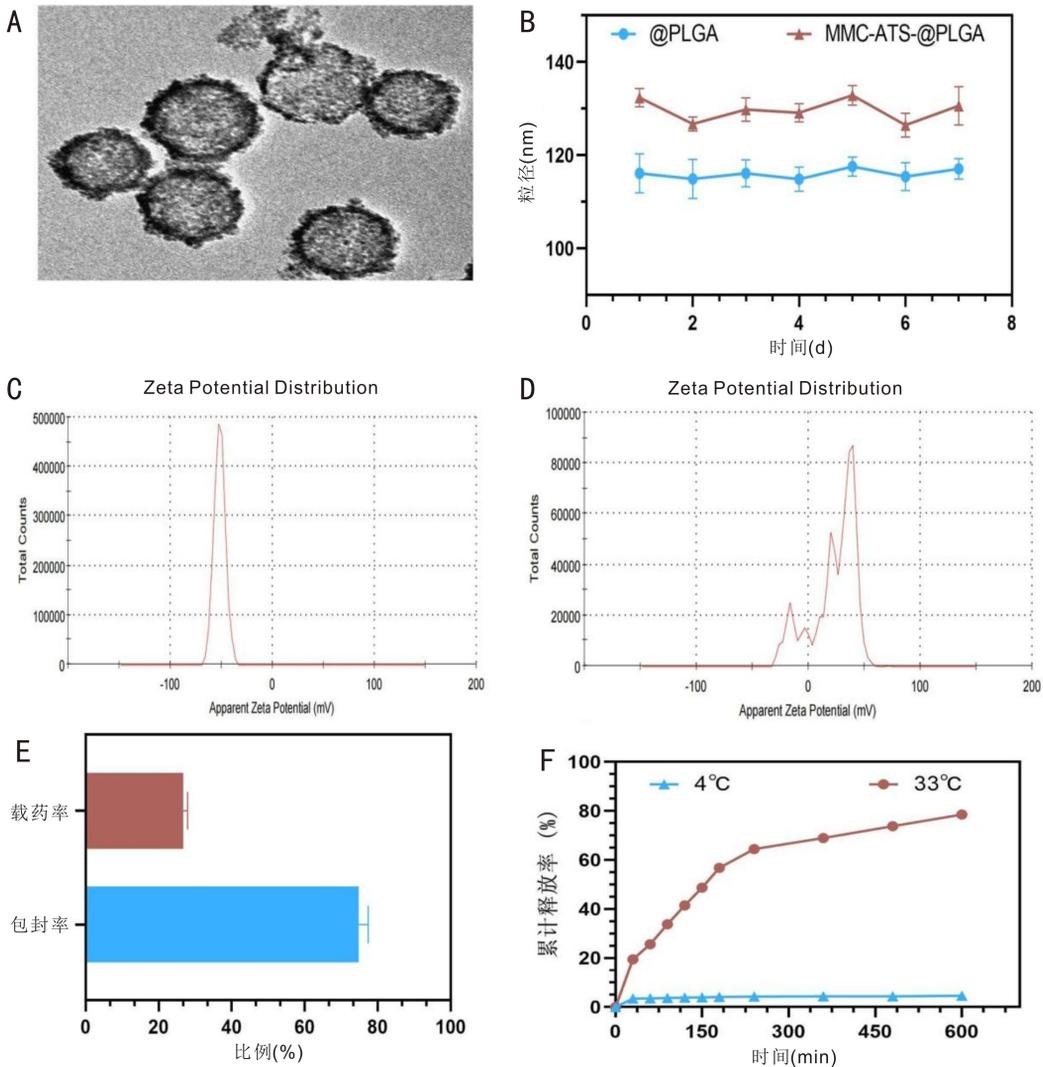


图1 MMC-ATS-@PLGA 纳米粒表征分析 A: MMC-ATS-@PLGA 的 TEM 扫描图(200 μg/mL); B: 马尔粒径仪监测 @PLGA 和 MMC-ATS-@PLGA 在 PBS 中 1 wk 内连续测得的粒径大小; C, D: @PLGA 和 MMC-ATS-@PLGA 的平均电位分布图; E: MMC-ATS-@PLGA 的包封率(EE)和载药量(LC); F: 在 4 °C 和 33 °C 环境下, PBS 溶液中 MMC-ATS-@PLGA 的体外累积释放。

**2.4 免疫组化角度分析 MMC-ATS-@PLGA 纳米粒抑制滤过泡瘢痕形成的效果** 在青光眼滤过术后第3 wk, 采用免疫组织化学方法直接测定各组 α-SMA、CTGF 和 III 型胶原纤维的表达, 炎症相关抗体的表达情况计算如下:  $H\text{-score} = \sum (pi \times xi) / 100 = (\text{弱强度百分比} \times 1) + (\text{中等强度百分比} \times 2) + (\text{强强度百分比} \times 3)$ , 结果提示各组 α-SMA、CTGF、III 型胶原纤维比较差异具有统计学意义 ( $F = 78.34, 94.75, 83.65$ , 均  $P < 0.05$ ), 与 FML 组 ( $118.37 \pm 2.58$ ) 和 MMC 组 ( $112.86 \pm 2.83$ ) 中 α-SMA 的表达相比, MMC-ATS-@PLGA ( $79.51 \pm 2.39$ ) 组下降最为明显, 与正常组 ( $63.67 \pm 1.92$ ) 接近。并且炎症因子 III 型胶原纤维和 CTGF 显示出相同的变化趋势, 见图 5。

**2.5 Elisa 实验分析 MMC-ATS-@PLGA 纳米粒体内抗瘢痕效果** 从动物模型中提取滤过泡区结膜组织蛋白用于 Elisa 实验, 结果表明, 各组 α-SMA、CTGF、III 型胶原纤维比较差异具有统计学意义 ( $F = 118.45, 102.54, 89.34$ , 均  $P < 0.05$ ), 与正常组相比, 控制组中 α-SMA、CTGF 和 III 型胶原纤维抗体的表达水平显著较高, 予以 FML、MMC 和 MMC-ATS-@PLGA 治疗 3 wk 后, 炎症因子表达逐渐下

降, 其中 MMC-ATS-@PLGA 组炎症因子表达下降最明显, 差异具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 见图 6。

### 3 讨论

随着人口老龄化, 青光眼患者也逐渐增多, 对于一些用降眼压药物后眼压控制不良的人群中, 青光眼滤过手术仍然是治疗的首选方法, 但术后结膜及巩膜瓣的纤维增生及瘢痕化仍然是导致手术失败的主要原因<sup>[17-18]</sup>。研究表明血小板在受损区域的血管处形成聚集, 激活内源性凝血级联反应, 进一步刺激释放各种生物活性的生长因子、炎症趋化细胞、成纤维细胞等, 随后滤过泡区组织在炎症因子诱导因子 (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 介导下, 分泌大量的炎症因子 α-SMA、CTGF、III 型胶原纤维, 诱导成纤维细胞分化为肌成纤维细胞, 从而导致伤口收缩并分泌富含胶原蛋白的细胞外基质, 最后重塑形成致密的胶原蛋白结膜下肌性瘢痕<sup>[19-20]</sup>。因此, 如何抑制青光眼术后炎症因子表达, 对于有效促进滤过泡形成显得格外重要。丝裂霉素 C 作为青光眼滤过术中使用的抑制纤维增殖的药物, 可以有效促进术后滤过泡良好形成, 阻止瘢痕形成, 但其存在严重的并发症, 如伤口渗漏、低眼压、角膜

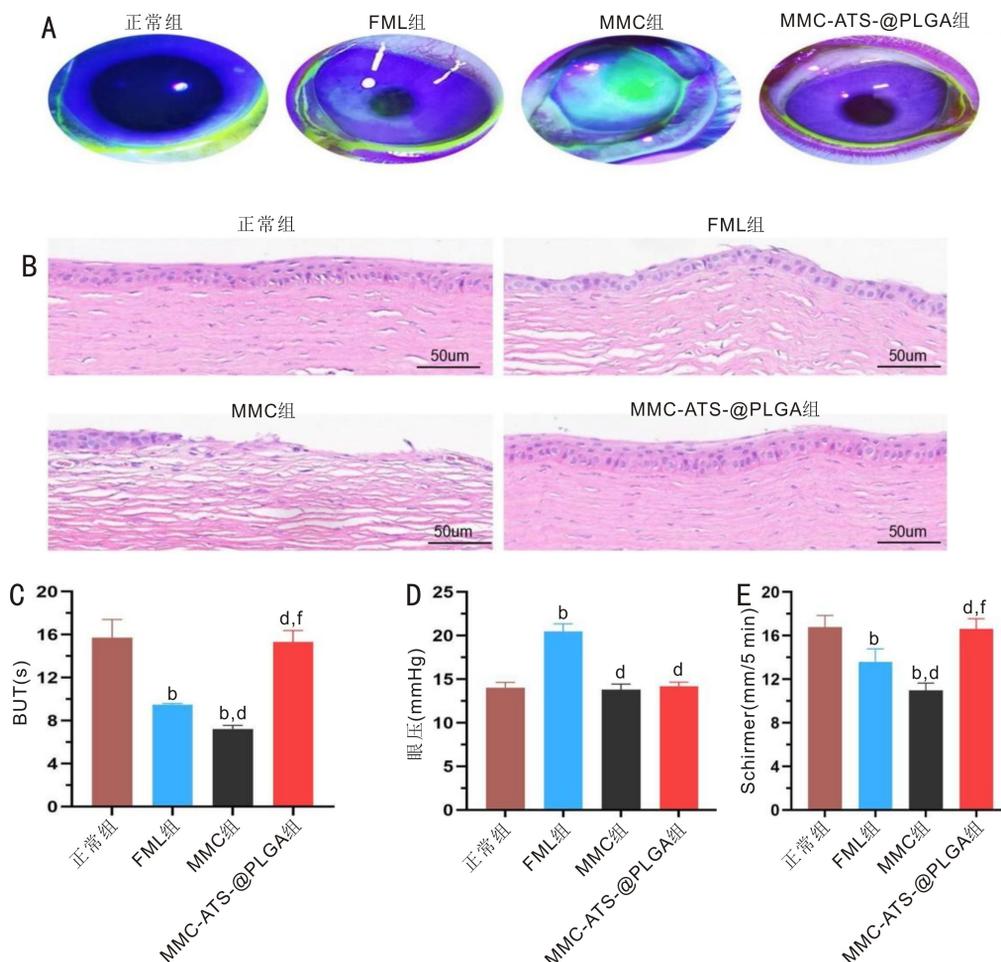


图2 药物作用3 wk后 MMC-ATS-@PLGA 纳米粒眼表生物安全性评估 A:各组角膜荧光染色表现;B:各组角膜 HE 染色形态学变化分析;C、D、E:各组 BUT、眼压、Schirmer 变化趋势;<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组;<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs FML 组;<sup>f</sup> $P < 0.01$  vs MMC 组。

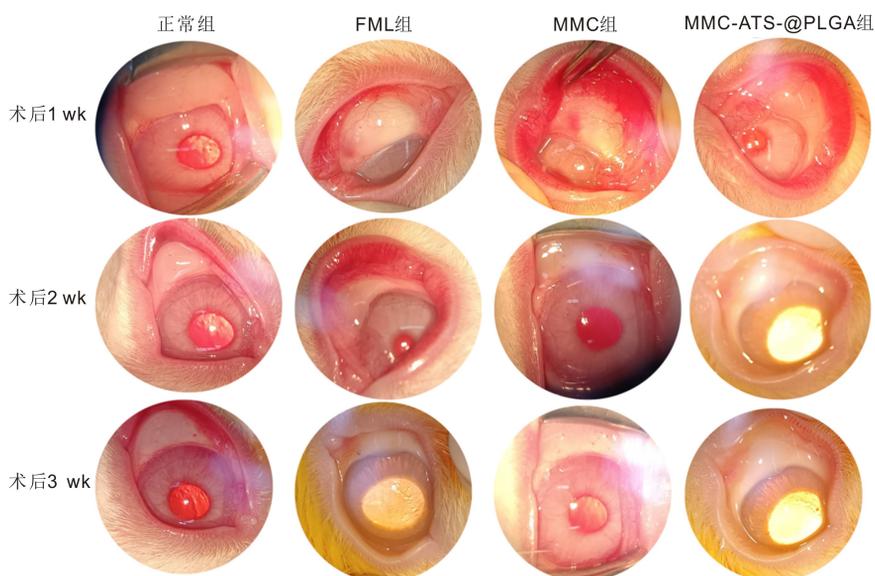


图3 青光眼滤过术后不同时间点 FML 组、MMC 组和 MMC-ATS-@PLGA 组不同时间点滤过泡形态变化。

毒性和眼内感染等,故临床使用受限<sup>[21]</sup>。因此,本研究拟利用纳米医学良好的生物相容性和缓释等特性,合成一种低毒和高效抗炎作用的纳米药物,从而为青光眼术后抗瘢痕增殖提供新的思路。

本研究通过薄膜分散-水化超声法成功制备 MMC 和 PLGA 的纳米粒(MMC-ATS-@PLGA),并进一步从粒径、电位、包封率、载药率等角度证实该纳米药物的成功合成。

马尔粒径仪显示 MMC-ATS-@PLGA 纳米粒在室温条件下可以在 PBS 溶液中稳定存在,同时温度释放曲线显示该纳米药物在眼表环境(33 °C)具有良好的释放特性;并且 MMC-ATS-@PLGA 纳米粒表面带正电荷,与眼表带负电荷的细胞膜具有相互吸引作用,可增强细胞对载药纳米粒的摄取,延长纳米药物的眼表滞留时间,从而更好地发挥药物的治疗作用<sup>[22]</sup>。

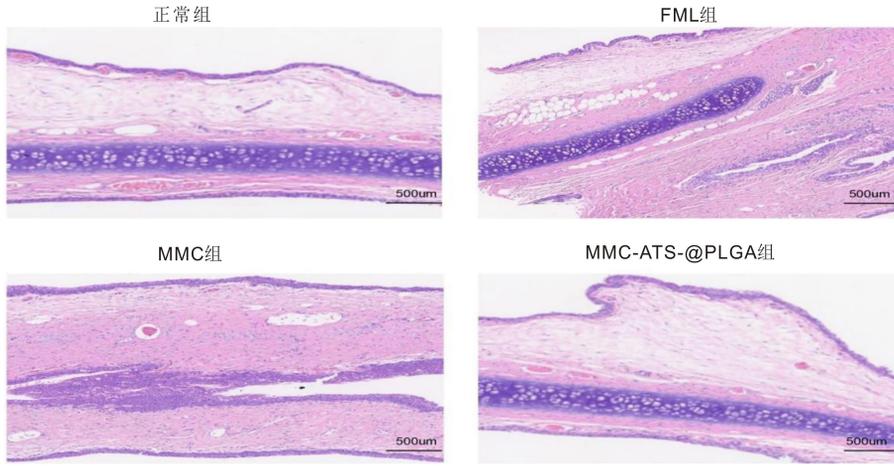


图4 正常组及FML组、MMC组和MMC-ATS-@PLGA组青光眼滤过术后3wk结膜HE染色变化。

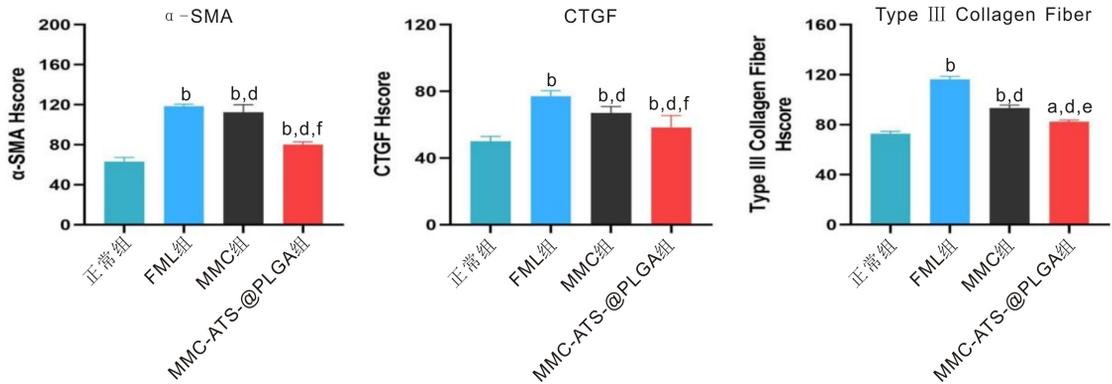
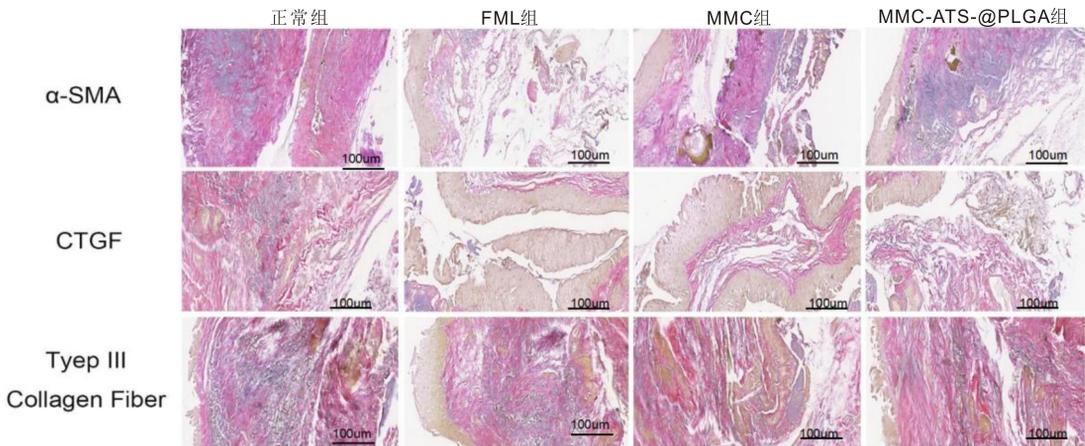


图5 青光眼滤过术后3wk基于免疫组织化学法分析FML组、MMC组和MMC-ATS-@PLGA组结膜组织中炎症因子α-SMA、CTGF和Ⅲ型胶原纤维表达情况 <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 正常组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs FML组; <sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$  vs MMC组。

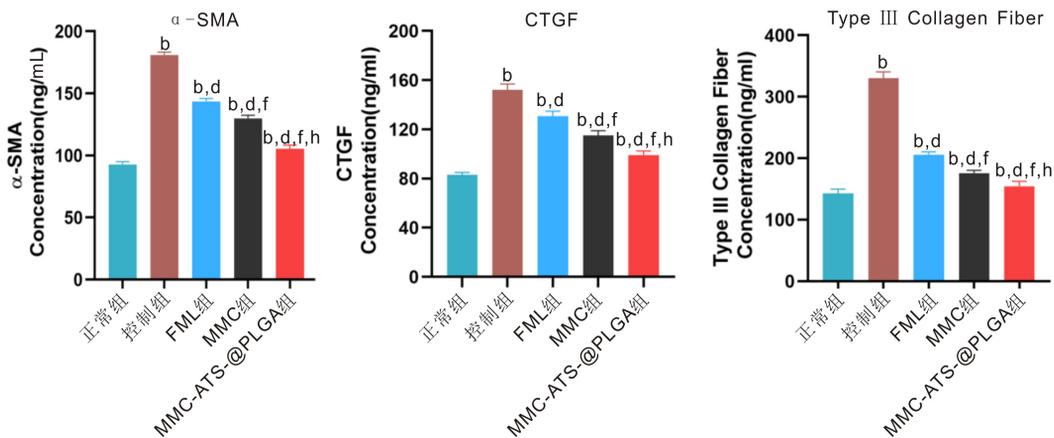


图6 青光眼滤过术后3wk基于Elisa实验法分析FML组、MMC组和MMC-ATS-@PLGA组结膜组织中炎症因子α-SMA、CTGF、Ⅲ型胶原纤维表达情况 <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 正常组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 控制组; <sup>e</sup> $P<0.01$  vs FML组; <sup>f</sup> $P<0.01$  vs MMC组。

随着纳米医学应用于眼科临床,研究表明 PLGA 是一种可降解的功能高分子有机化合物,具有良好的生物相容性、无毒、良好的成囊和成膜的性能,被广泛应用于制药、医用工程材料和现代化工业领域<sup>[23]</sup>。本研究通过在兔眼药物治疗 3 wk 后,采用角膜荧光染色进行分析,结果显示 MMC 组角膜呈弥漫性点片状染色, FML 组角膜轻微点片状染色,而 MMC-ATS-@ PLGA 组角膜上皮无明显荧光染色。进一步提取角膜组织进行 HE 染色,研究发现 FML 组和 MMC 组的角膜上皮呈现不同程度的变薄,其中 MMC 组最为严重。然而,MMC-ATS-@ PLGA 组的角膜上皮形态没有显著变化。研究进一步分析了药物对眼表泪液分泌的影响,结果显示 MMC-ATS-@ PLGA 组和正常组的 BUT 和 Schirmer 测试结果无统计学差异,而 FML 组和 MMC 组的 BUT 和 Schirmer 结果均小于 MMC-ATS-@ PLGA 组。此外,与长期使用 FML 容易导致眼压升高相比,本研究表明 MMC-ATS-@ PLGA 对眼压没有影响。同时研究进一步对实验兔的血液进行血常规、肝肾功等指标分析,结果表明该纳米药物不影响实验动物体内白细胞、淋巴细胞、血红蛋白、血小板、丙氨酸氨基转移酶、门冬氨酸氨基转移酶、肾小球滤过率、肌酐、尿素等指标,同时实验兔心肝脾肺肾等主要脏器的 HE 染色结果未见明显异常,进一步证实 MMC-ATS-@ PLGA 纳米药物具有良好的生物相容性。

本研究进一步分析青光眼滤过术后 1-3 wk 不同药物组滤过泡的变化趋势,结果发现控制组滤过泡基本消失, FML 和 MMC 组滤过泡小而扁平,然而 MMC-ATS-@ PLGA 组中的过滤泡凸起,其尺寸符合实验要求。对手术区结膜组织变化进行病理分析,结果显示,与控制组胶原纤维排列紊乱相比,MMC-ATS-@ PLGA 组结膜组织形态与正常组相似。此外,结膜组织免疫组化和 Elisa 实验均从蛋白组学角度证实 MMC-ATS-@ PLGA 可有效降低炎症因子  $\alpha$ -SMA、CTGF 和 III 型胶原纤维的表达,阻止滤过区瘢痕化,从而有效促进滤过泡良好形成。该过程中 MMC-ATS-@ PLGA 特异性作用于细胞增生周期的 DNA 合成器(S 期),通过抑制核糖胸腺苷影响 DNA 合成,从而显著抑制 Tenon 囊成纤维细胞增生,维持滤过通道的功能,其效果优于 FML<sup>[24-25]</sup>。

与传统治疗方法相比,在生物安全性方面,通过角膜荧光染色、BUT、Schirmer、眼压和心肝脾肺肾等重要脏器病理解剖分析,均证实 MMC-ATS-@ PLGA 纳米药物的生物安全性优于传统药物;同时进一步从抑制滤过泡瘢痕的效果分析,通过免疫组化和 Elisa 实验分析各组炎症因子表达情况分析,结果显示该纳米药物抗炎效果优于传统药物,其临床应用前景值得进一步探索,但对于不同类型青光眼患者的适用性和长期效果分析需进一步进行研究。

本研究采用薄膜分散-水化超声法成功合成一种针对青光眼滤过术后抑制滤过泡瘢痕增殖的纳米药物,即 MMC-ATS-@ PLGA,该药物具有稳定的物理化学性质、良好的生物相容性和更佳的抗炎效果,其通过抑制滤过泡区炎症因子  $\alpha$ -SMA、CTGF 和 III 型胶原纤维的表达,阻止滤过泡区瘢痕化形成,从而提高青光眼滤过手术的成功率,值得进一步研究。

#### 参考文献

[1] Fernández-Vigo JI, García-Feijóo J, Martínez-de-la-Casa JM, et al. Morphometry of the trabecular meshwork *in vivo* in a healthy population using Fourier-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015,56(3):1782-1788.

[2] Raghunathan VK, Morgan JT, Park SA, et al. Dexamethasone stiffens trabecular meshwork, trabecular meshwork cells, and matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015,56(8):4447-4459.

[3] Joshi P, Dangwal A, Guleria I, et al. Glaucoma in adults—diagnosis, management, and prediagnosis to end-stage, categorizing glaucoma's stages: a review. *J Curr Glaucoma Pract*, 2022,16(3):170-178.

[4] 张彤, 吴杰, 李虎, 等. 抗青光眼滤过术对老年青光眼患者功能性滤过泡形成率的影响. *中国老年学杂志*, 2020,40(1):132-134.

[5] 管英朝, 李桂芹, 李克芳. 小梁切除术联合药物干预治疗新生血管性青光眼疗效观察. *海南医学*, 2018,29(1):126-127.

[6] 郁艳萍, 刘武. 脉络膜厚度与特发性黄斑裂孔和黄斑前膜关系的研究进展. *眼科新进展*, 2016,36(9):898-900.

[7] 姜艳碧, 胡敏. 原发性开角型青光眼视神经损伤不同阶段血清细胞因子水平分析及临床意义. *海南医学院学报*, 2014,20(4):561-563.

[8] 魏雅慧, 李雪迎, 才瑜. 选择性激光小梁成形术与抗青光眼药物治疗青光眼的 Meta 分析. *中华实验眼科杂志*, 2016,34(11):1019-1024.

[9] 陈君毅, 孔祥梅, 孙兴怀. 选择性激光小梁成形术治疗糖皮质激素性青光眼的疗效观察. *中华实验眼科杂志*, 2014,32(2):168-171.

[10] 黄学思. 青光对抗青光眼术后滤过道瘢痕化中胶原纤维、 $\alpha$ -SMA 及 FN 的影响. *国际眼科杂志*, 2019,19(6):906-910.

[11] Lee EJ, Han JC, Park DY, et al. Effect of connective tissue growth factor gene editing using adeno-associated virus-mediated CRISPR-Cas9 on rabbit glaucoma filtering surgery outcomes. *Gene Ther*, 2021,28(5):277-286.

[12] 伍志琴, 聂尚武, 王晓琴, 等. Ex-press 青光眼微型引流钉联合丝裂霉素 C 治疗难治性青光眼. *国际眼科杂志*, 2017,17(4):758-760.

[13] 张文君, 王晴, 吴梦婷, 等. 聚合物 PEG-PLGA 在纳米给药系统中的应用研究进展. *药学研究*, 2019,38(9):532-538.

[14] 余勇波, 唐健, 张桂龙, 等. 载 BDNF 基因 PEG-PLGA 纳米微球的制备及其转染外源性神经干细胞的研究. *临床神经外科杂志*, 2019,16(2):109-114.

[15] Cillino S, di Pace F, Casuccio A, et al. Deep sclerectomy versus punch trabeculectomy: effect of low-dosage mitomycin C. *Ophthalmologica*, 2005,219(5):281-286.

[16] 刘勇, 杨海玉. 诊断免疫组织化学阴性对照的标准化:来自国际特设专家委员会的建议. *临床与实验病理学杂志*, 2016,32(2):121-122.

[17] 张俊芳, 史桂桃, 陈启. 抗瘢痕化治疗在青光眼滤过手术中的研究进展. *内蒙古医科大学学报*, 2022,44(6):664-668,672.

[18] 吴迪, 张行, 闫永钦, 等. 抗青光眼滤过手术后瘢痕化的研究进展. *临床与病理杂志*, 2021,41(8):1946-1951.

[19] Su Y, Zhang BL, Sun RW, et al. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application. *Drug Deliv*, 2021,28(1):1397-1418.

[20] Arranz-Romera A, Davis BM, Bravo-Osuna I, et al. Simultaneous co-delivery of neuroprotective drugs from multi-loaded PLGA microspheres for the treatment of glaucoma. *J Control Release*, 2019,12(2):26-38.

[21] Sabur Huri, Baykara Mehmet. 丝裂霉素 C 联合粘小管成形术治疗开角型青光眼的疗效. *国际眼科杂志*, 2017,17(9):1605-1609.

[22] 李涛, 张玉, 朱胜兰, 等. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)负载汉防己甲素纳米微球治疗干眼的效果评价. *眼科新进展*, 2023,43(9):697-702.

[23] 全鲁亚, 乔斌, 王志刚, 等. 载 GOD/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的 PLGA 纳米粒子对视网膜母细胞瘤疗效的体外研究. *解放军医学杂志*, 2019,44(5):382-387.

[24] 孔亚男, 陆宏, 陈颖, 等. 青光眼滤过术后瘢痕形成机制及抗瘢痕化研究进展. *国际眼科杂志*, 2019,19(10):1688-1691.

[25] 孟如法, 赵炳坤, 李春达. 干扰素  $\alpha$ -2b 抗青光眼滤过术后瘢痕形成的临床观察. *中国药师*, 2015,18(4):595-597.