

苏拉明在兔小梁切除术中的作用

要 博,辛志坤

作者单位:(100012) 中国北京市,航空总医院眼科
 作者简介:要博,硕士,主治医师,研究方向:青光眼。
 通讯作者:要博.atinybug@sina.com
 收稿日期:2014-12-30 修回日期:2015-03-18

Effect of suramin on trabeculectomy in rabbit

Bo Yao, Zhi-Kun Xin

Department of Ophthalmology, Aviation General Hospital, Beijing 100012, China

Correspondence to: Bo Yao. Department of Ophthalmology, Aviation General Hospital, Beijing 100012, China. atinybug@sina.com

Received:2014-12-30 Accepted:2015-03-18

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of suramin concentration changes on trabeculectomy in rabbit, and to provide treatment strategies for glaucoma on the basis of experiment.

• **METHODS:** Thirty-two albino rabbits were randomly divided into four groups, including standard control group, experimental group I, experimental group II, and experimental group III. Each eye was performed standard trabeculectomy. During surgery, standard control group was given a piece of cotton with 0.3mg/mL mitomycin C (MMC) for 2min, and the other three groups were given a piece of cotton with 0.3, 0.4, and 0.5mg/mL suramin respectively for 2min. The filtering blebs and intraocular pressure (IOP) were observed at the 3, 7, 15, and 30d after surgery. Some conjunctival specimen were observed with histochemical (HE staining) and immunohistochemical methods.

• **RESULTS:** At postoperative 7, 15, and 30d, the changes of the IOP, functional filtering blebs, and the number of positive cell nuclear in experimental group II and experimental group III were significantly different compared with those in standard control group and experimental group I (all $P < 0.05$), and the differences between experimental group I and standard control group were not significant ($P > 0.05$). The changes of the IOP and the number of positive cell nuclear in experimental group III were significantly different compared with those in experimental group II ($P < 0.05$), whereas the differences in functional filtering blebs between experimental group III and experimental group II were not significant ($P > 0.05$). The status of filtering channel in experimental group II and experimental group

III were better than those in experimental group I and standard control group.

• **CONCLUSION:** The concentration of suramin has a significantly influence on its effect. When the concentration is 0.3mg/mL, the antiproliferative effect of suramin is no more than that of MMC. The effect of 0.4, 0.5mg/mL suramin is better than MMC. 0.5mg/mL suramin has a better effect on controlling IOP and suppressing the growth of fibroblasts than 0.4mg/mL suramin.

• **KEYWORDS:** trabeculectomy; suramin; concentration; proliferating cell nuclear antigen

Citation: Yao B, Xin ZK. Effect of suramin on trabeculectomy in rabbit. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(4):601-604

摘要

目的: 研究苏拉明的浓度改变对其在兔小梁切除术中作用效果的影响,为青光眼的治疗提供实验依据。

方法: 新西兰白兔 32 只随机分为四组:标准组、实验 I 组、实验 II 组和实验 III 组,双眼均行标准小梁切除术。术中标准组于巩膜瓣下一次性应用 0.3mg/mL 丝裂霉素 C 棉片 2min,其它 3 组术中分别于巩膜瓣下一次性应用 0.3,0.4,0.5mg/mL 苏拉明棉片 2min。分别在术后第 3,7,15,30d 检查眼压、滤过泡情况,取滤过道附近组织分别行 HE 染色和免疫组化染色。

结果: 术后第 7,15,30d,四组眼压、功能性滤过泡、PCNA 染色阳性细胞核数比较,实验 II 组和 III 组与实验 I 组和标准组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);实验 I 组与标准组的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验 III 组的眼压和 PCNA 染色阳性细胞核数与实验 II 组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);实验 III 组的功能性滤过泡与实验 II 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验 II 组和实验 III 组的滤过道均清晰可见,滤过道开放程度均高于标准组和实验 I 组。

结论: 苏拉明的浓度对其在兔小梁切除术中的作用效果有显著影响。0.3mg/mL 苏拉明的作用效果与 MMC 相当;0.4,0.5mg/mL 苏拉明的作用效果显著优于 MMC;0.5mg/mL 苏拉明的降眼压和抑制成纤维细胞增殖的效果优于 0.4mg/mL 苏拉明。

关键词: 小梁切除术;苏拉明;浓度;增殖细胞核抗原

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.4.08

引用: 要博,辛志坤. 苏拉明在兔小梁切除术中的作用. 国际眼科杂志 2015;15(4):601-604

0 引言

青光眼是一类致盲率高且治疗困难的眼科常见病,手术是目前药物及激光治疗不能控制眼压时的重要手段。

但术后由于滤过道成纤维细胞增殖和胶原沉积,导致滤过泡瘢痕和无功能型滤过泡形成,致使手术失败^[1,2]。临床上应用的术后抗瘢痕形成药物主要为丝裂霉素 C(MMC)和5-氟尿嘧啶(5-FU),其对于改善滤过泡功能、降低眼压、提高手术成功率具有一定作用,但存在诸多并发症和副作用,在很大程度上限制了其临床使用^[3]。因此,寻找一种低毒性、安全、有效、作用持久的抗增殖药物是该领域的一个重要研究方向。苏拉明是一种很有前景的新型抗瘢痕形成药物,但其使用浓度尚有争议,浓度与效果的关联尚无定论^[4,5],有待进一步研究。本研究将不同浓度的苏拉明应用于兔小梁切除术中,通过眼压、滤过泡及组织病理学的变化,考察苏拉明的浓度对其作用效果的影响,为临床治疗提供实验支持和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 本研究已通过单位的动物伦理审查。选用河北医科大学动物实验中心提供的健康新西兰白兔32只,体质量 2.5 ± 0.2 kg,雌雄兼用,4~5月龄。实验前排除全身性病变,双眼前节检查及眼底、眼压检查均正常。采用随机数字表法分为4组,每组8只16眼。分别记为标准组、实验I组、实验II组和实验III组。

1.1.2 试剂与仪器 苏拉明(型号50mg/支)为美国sigma公司生产;盐酸丙美卡因为美国Alcon公司生产;丝裂霉素C(MMC)为华北制药厂生产;PCNA试剂盒由北京中杉生物制品有限公司提供。主要仪器包括:Schiotz眼压计;裂隙灯显微镜;显微眼科手术器械;眼科手术显微镜;石蜡切片机等。

1.2 方法

1.2.1 术前检查 用荧光素染色法在裂隙灯显微镜下观察,确保角膜上皮无损伤。经托品酰胺散瞳后,在直接检眼镜和间接检眼镜下观察眼底。眼压均在上午9:00~11:00测量,在兔清醒情况下,采用0.5%盐酸丙美卡因进行表面麻醉,每只眼测量3次,取其平均值作为该眼眼压值。

1.2.2 动物模型的建立 沿兔耳缘静脉缓慢注射速眠新(846)0.1mL/kg,待其麻醉后,进行眼周围消毒并固定于手术台上,在手术显微镜下依次对各眼行小梁切除:铺消毒单及孔巾,用开睑器开睑,固定上直肌,在上直肌内侧沿角巩膜缘剪开球结膜,钝性分离球结膜,做以穹隆为基底的结膜瓣,暴露准备做巩膜瓣的区域。在颞上方做以角巩膜缘为基底的4mm×5mm的1/2厚度的长方形巩膜瓣;于巩膜瓣下放置浸有药物的棉片,标准组应用0.3mg/mL MMC棉片,实验I组、实验II组和实验III组分别应用0.3、0.4、0.5mg/mL苏拉明海绵片。2min后去掉棉片,用60mL生理盐水冲洗;随后切除瓣下深层巩膜组织,尺寸均为1mm×3mm。作虹膜根部切除后,将巩膜瓣复位对合,于其两游离角用10/0尼龙线各缝合1针,于结膜切口的两端角巩膜缘处各1针缝合结膜切口。建立滤过手术模型。

1.2.3 术后观察

1.2.3.1 角膜与结膜 术后第3,7,15,30d,采用荧光素染色法在裂隙灯显微镜下观察角膜上皮损伤情况,计算角膜损伤比例;采用Seidel试验观察结膜伤口渗漏情况。

1.2.3.2 浅前房分型 浅I级:全部前房极浅,周边前房呈裂隙状,小于1/5角膜厚度;浅IIa级:仅虹膜小环以内有极浅的前房;浅IIb级:仅瞳孔内有极浅的前房;浅III

级:虹膜和晶状体全部与角膜相贴,前房完全消失。

1.2.3.3 滤过泡 术后第3,7,15,30d裂隙灯下观察各组滤过泡形态,并计算功能性滤过泡和非功能性滤过泡数目。按Kronfeld标准分型:I型为微小囊泡型,II型为扁平弥漫型,III型为缺如型,IV型为包裹型。其中:I型、II型为功能性滤过泡,III型、IV型为非功能性滤过泡。

1.2.3.4 眼压 术后第3,7,15,30d测量眼压,时间和方法同术前,比较四组术后各时间段眼压值。

1.2.3.5 组织病理学 术后第3,7,15,30d各组在完成临床指标观察后,空气注射处死动物,随机取2只兔4眼,摘除眼球。用锋利刀片沿矢状面将眼球壁一分为二,剪取包括顺时针方向9:00~3:00位角膜缘前后自1~2mm透明角膜至结膜瓣连续缝合后5mm处的结膜、结膜下组织及巩膜的块状组织,浸入10%福尔马林固定液中固定,经脱水、透明、石蜡包埋后连续切片,厚约4 μ m。作HE染色,光镜下观察滤过道开放情况;免疫组化染色观察PCNA阳性表达,阳性细胞为核界限清楚的棕色的成纤维细胞,计算术后各阶段滤过道处5个高倍视野阳性细胞核的数目,比较各组数量差异。

统计学分析:所有实验数据采用SPSS 19.0统计软件包进行统计分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料组间比较采用LSD-*t*检验。计数资料组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜上皮损伤比率 术后3d标准组、实验I组、II组和III组角膜点状着色分别有7,6,4和2眼,实验II组和III组与实验I组和标准组之间的差异有统计学意义($P<0.05$),各眼均无角膜水肿。术后7d各组分别有4,3,1和1眼存在角膜点状着色,实验II组和III组与实验I组和标准组之间的差异有统计学意义($P<0.05$)。术后15d各组角膜上皮均恢复正常。

2.2 结膜伤口漏比率 术后3d标准组和实验I组分别有3眼和1眼出现结膜伤口渗漏,术后7d伤口愈合。实验II组和III组均未发现结膜伤口渗漏。

2.3 前房 术后3d标准组和实验I组各有1眼出现I级浅前房,但均在术后7d恢复。各组所有眼底均未见明显异常改变。

2.4 滤过泡情况 术后3d各组滤过泡均呈隆起状,边界清晰,为功能性滤过泡;此后各组滤过泡开始变为扁平状,功能性滤过泡以II型为主。术后第7,15,30d,实验II组和III组的功能性滤过泡数目均高于实验I组和标准组,差异均有统计学意义($P<0.05$);实验III组与实验II组之间的差异无统计学意义($P>0.05$);实验I组与标准组之间的差异无统计学意义($P>0.05$)(表1)。

2.5 眼压变化 术前及术后3d各组眼压之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。术后各组眼压均出现明显下降,术后第7,15,30d,实验I组与标准组之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),实验II组和III组的眼压显著低于实验I组和标准组,以实验III组最低,差异均有统计学意义($P<0.05$,表2)。

2.6 HE染色 术后第3d,各组滤过道均开放,滤过道及滤过泡腔内有少量的炎性细胞浸润;术后第7,15d,各组炎性细胞逐渐减少,标准组和实验I组均出现一些新生的胶原纤维,实验II组和III组仍可观察到通畅的滤过道;术后30d,标准组和实验I组的滤过道均不明显,可见较

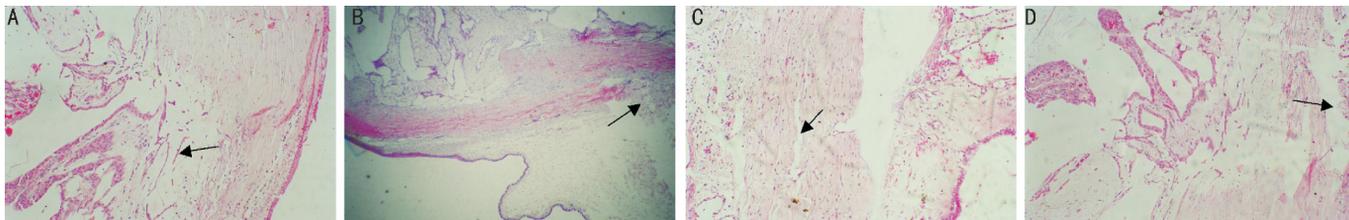


图1 术后30d 滤过道形态(HE×100,箭头指向为滤过道) A:标准组;B:实验I组;C:实验II组;D:实验III组。

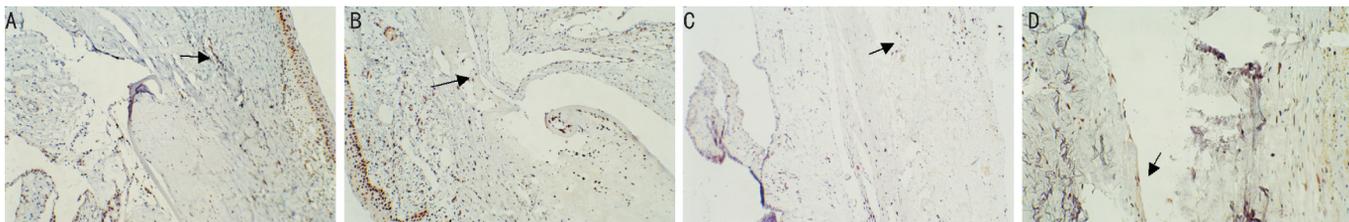


图2 术后30d 各组阳性细胞表达(SABC×200,箭头附近的棕色细胞为阳性细胞) A:标准组;B:实验I组;C:实验II组;D:实验III组。

表1 术后各组功能性滤过泡与非功能性滤过泡数量

分组	术后3d		术后7d		术后15d		术后30d		个
	功能性	非功能性	功能性	非功能性	功能性	非功能性	功能性	非功能性	
标准组	16	0	9	3	4	4	1	3	
实验I组	16	0	8	4	3	5	1	3	
实验II组	16	0	11 ^{a,c}	1	6 ^{a,c}	2	3 ^{a,c}	1	
实验III组	16	0	12 ^{a,c}	0	7 ^{a,c}	1	3 ^{a,c}	1	

^a $P < 0.05$ vs 标准组; ^c $P < 0.05$ vs 实验I组。

表2 术前术后不同时间各组眼压

($\bar{x} \pm s$, kPa)

分组	术前		术后3d		术后7d		术后15d		术后30d	
	眼数	眼压	眼数	眼压	眼数	眼压	眼数	眼压	眼数	眼压
标准组	16	2.52±0.14	16	0.86±0.18	12	1.85±0.15	8	1.93±0.22	4	2.18±0.08
实验I组	16	2.55±0.21	16	0.82±0.16	12	1.82±0.19	8	1.95±0.18	4	2.20±0.11
实验II组	16	2.53±0.20	16	0.87±0.19	12	1.64±0.19 ^{a,c}	8	1.72±0.19 ^{a,c}	4	1.83±0.15 ^{a,c}
实验III组	16	2.50±0.16	16	0.85±0.19	12	1.46±0.13 ^{a,c,e}	8	1.51±0.13 ^{a,c,e}	4	1.61±0.09 ^{a,c,e}

^a $P < 0.05$ vs 标准组; ^c $P < 0.05$ vs 实验I组; ^e $P < 0.05$ vs 实验II组。

表3 术后各组不同时间阳性细胞数

($\bar{x} \pm s$, 个/ mm^2)

分组	术后3d	术后7d	术后15d	术后30d
标准组	38.17±3.38	24.17±2.49	19.32±1.88	13.01±1.54
实验I组	37.77±3.34	24.90±2.78	19.59±2.30	12.45±1.95
实验II组	37.19±3.30	17.83±2.03 ^{a,c}	13.18±2.13 ^{a,c}	6.89±1.38 ^{a,c}
实验III组	36.63±3.13	12.02±2.19 ^{a,c,e}	9.05±1.38 ^{a,c,e}	3.87±1.37 ^{a,c,e}

^a $P < 0.05$ vs 标准组; ^c $P < 0.05$ vs 实验I组; ^e $P < 0.05$ vs 实验II组。

多的胶原纤维,滤过道处呈现一定程度的纤维瘢痕组织阻塞。实验II组和III组滤过道仍清晰可见,滤过道开放程度高于标准组和实验I组(图1)。

2.7 免疫组化染色 术后3d 各组阳性细胞数丰富,细胞核形态各异,各组阳性细胞数无统计学差异($P > 0.05$);随着时间的延长,各组的阳性细胞数逐渐减少且细胞核形态趋于一致。术后7,15,30d,实验I组与标准组相比无统计学意义($P > 0.05$),实验II组和III组的阳性细胞核数目低于标准组和实验I组,有统计学差异($P < 0.05$)。实验III组与其它3组比较,阳性细胞核最少,有统计学差异($P < 0.05$),见表3,图2。

3 讨论

青光眼滤过术常见的并发症是术后结膜-Tenon囊-巩膜水平的成纤维细胞过度增生,胶原沉积,滤过区瘢痕化,滤过道堵塞,使手术失败。寻找疗效高、毒副作用小的新型抗瘢痕形成药物,是提高青光眼滤过术成功率的关键环节。

苏拉明是一种多磺酸萘醌盐,易溶于水,在血循环中可存留6mo,不易被组织吸收,不能透过血-脑屏障和血-房水屏障^[6]。上述特性使其不易被吸收和降解,利于长期保留在用药部位形成局限性高浓度作用区,起到抗增殖作用。苏拉明在血管内膜增生狭窄、自身免疫性疾病、慢性阻塞性肺病甚至肿瘤等疾病防治中均具有显著效果。且

对多种细胞表现出一定的生长抑制作用,可有效抑制血管内皮细胞、皮肤成纤维细胞、晶状体上皮细胞、视网膜色素上皮细胞的增殖^[7-9]。以往的研究表明,苏拉明抑制青光眼术后瘢痕形成的可能机制包括^[10,11]:(1)可抑制多种生长因子与相应受体结合,减少某些生长因子受体的表达,可解离已与受体结合的生长因子,作用迅速。(2)阻断血管内皮生长因子与其受体结合,抑制新生血管形成。(3)特异性降低眼纤维细胞 I, III 型胶原的产生。

MMC 已在临床应用多年,是较为成熟的抗瘢痕药物。鉴于此,本研究将 0.3mg/mL MMC 作为标准组对苏拉明的作用效果进行评价,苏拉明的 3 个浓度 0.3,0.4 和 0.5mg/mL 均在 MMC 的常规使用浓度附近。因此,与 MMC 的比对结果更具有实际意义和临床价值。本研究结果显示,术后早期各组均可形成功能性滤过泡,自术后 7d 起,实验 II 组和 III 组的功能性滤过泡数目高于实验 I 组和标准组($P<0.05$),实验 III 组与实验 II 组之间的差异无统计学意义($P>0.05$),实验 I 组与标准组之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。表明浓度为 0.3mg/mL 苏拉明的作用效果与 MMC 相当,浓度达到 0.4,0.5mg/mL 时其作用效果优于 MMC,可更有效的抑制滤过道纤维组织的增生和瘢痕形成,建立有效的房水外引流,保持滤过道的通畅和形成良好的功能性滤过泡。

术后各组眼压均出现明显下降,术后第 7,15,30d 实验 I 组与标准组之间的差异无统计学意义($P>0.05$),实验 II 组和 III 组与实验 I 组和标准组之间的差异有统计学意义($P<0.05$),实验 III 组与其它 3 组之间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。表明 0.3mg/mL 苏拉明的眼压控制效果与 MMC 相当,随浓度提高,其眼压控制的优势逐渐明显,0.4,0.5mg/mL 苏拉明的眼压控制效果优于 MMC。

本研究采用免疫组化染色检测兔眼滤过术后成纤维细胞的增殖活性,并评价苏拉明的浓度对成纤维细胞的影响。实验 I 组与标准组之间阳性细胞数目差异无统计学意义($P>0.05$),实验 II 组和 III 组与标准组和实验 I 组之间的差异均有统计学意义($P<0.05$),实验 III 组与其它 3 组之间的差异均具有统计学意义($P<0.05$)。表明苏拉明浓度对其抗成纤维细胞增殖的能力影响显著,0.3mg/mL 苏拉明的作用效果与 MMC 相当,0.4,0.5mg/mL 苏拉明

抑制成纤维细胞增殖的效果优于 MMC。

总之,苏拉明在青光眼小梁滤过术中一次性局部应用,操作简单,可行性强。苏拉明的浓度对其在青光眼滤过术中的作用效果,包括降眼压、维持滤过泡功能、维持滤过道通畅、抑制成纤维细胞增殖等,均具有明显影响。0.3mg/mL 苏拉明的作用效果与 MMC 相当,0.4,0.5mg/mL 苏拉明的作用效果均显著优于 MMC,且未发现对眼部存在明显毒副作用。0.5mg/mL 苏拉明的降眼压和抑制成纤维细胞增殖的效果优于 0.4mg/mL 苏拉明,二者维持功能性滤过泡及滤过道开放的作用差别不明显,在应用中可根据需要选择苏拉明的浓度。相信随着研究的进一步深入,苏拉明可成为一种新型抗青光眼手术瘢痕形成药物。

参考文献

- 1 葛坚. 青光眼研究进展与前景. 中华眼科杂志 2007;43(3):286-288
- 2 史晓芹, 刘苏. 青光眼滤过手术抗瘢痕治疗最新研究进展. 国际眼科杂志 2012;12(6):1088-1090
- 3 甘露, 唐飞, 唐莉. 青光眼滤过术后抗瘢痕药物研究进展. 国际眼科杂志 2012;12(8):1511-1514
- 4 王爱媛, 高殿文, 杨扬. 舒拉明在实验性青光眼滤过性手术中应用. 辽宁药物与临床 2002;5(2):80-81
- 5 熊林杰, 胡义珍, 曹阳. 兔眼滤过术联合应用苏拉明后滤过道的组织病理学观察. 眼视光学杂志 2008;10(6):449-452
- 6 Huang HW, Mohan SK, Yu C. The NMR solution structure of human epidermal growth factor (hEGF) at physiological pH and its interactions with suramin. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402(4):705-710
- 7 Wiese C, Nikolova T, Zahanich I, et al. Differentiation induction of mouse embryonic stem cells into sinus node-like cells by suramin. *Int J Cardiol* 2011;147(1):95-111
- 8 Tayel A, Abd El Galil KH, Ebrahim MA, et al. Suramin inhibits hepatic tissue damage in hepatocellular carcinoma through deactivation of heparanase enzyme. *Eur J Pharmacol* 2014;728(2):151-160
- 9 El-Kik CZ, Fernandes FFA, Tomaz MA, et al. Neutralization of Apis mellifera bee venom activities by suramin. *Toxicol* 2013;67(3):55-62
- 10 Sahu D, Saroha A, Roy S, et al. Suramin ameliorates collagen induced arthritis. *Int Immunopharmacol* 2012;12(1):288-293
- 11 Margolles-Clark E, Jacques-Silva MC, Ganesan L, et al. Suramin inhibits the CD40 - CD154 costimulatory interaction: A possible mechanism for immunosuppressive effects. *Biochem Pharmacol* 2009;77(7):1236-1245