

# 吡非尼酮浸泡生物羊膜对兔青光眼模型滤过术后瘢痕形成的作用

张 帅<sup>1</sup>, 姚贻华<sup>2</sup>, 郑扬菁<sup>1</sup>, 吴 平<sup>3</sup>, 朱益华<sup>2</sup>

引用: 张帅, 姚贻华, 郑扬菁, 等. 吡非尼酮浸泡生物羊膜对兔青光眼模型滤过术后瘢痕形成的作用. 国际眼科杂志, 2024, 24(2): 189-195.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81970789); 福建省自然科学基金项目 (No. 2020J05251)

作者单位: <sup>1</sup>(350008) 中国福建省福州市, 福州东南眼科医院 (金山新院); <sup>2</sup>(350004) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院<sup>2</sup>眼科; <sup>3</sup>病理科

作者简介: 张帅, 毕业于福建医科大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 青光眼、白内障、眼底病。

通讯作者: 朱益华, 毕业于中南大学湘雅医学院, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 眼科中心行政主任, 研究方向: 青光眼、白内障、屈光不正. zhuyihua209@163.com

收稿日期: 2023-09-06 修回日期: 2023-12-28

## 摘要

**目的:** 探讨吡非尼酮 (PFD) 浸泡生物羊膜在兔青光眼模型中的应用, 评价其对兔青光眼模型的抗瘢痕效果及毒副作用。

**方法:** 健康新西兰白兔 72 只右眼采用前房注射复方卡波姆溶液的方法建立青光眼模型后随机分为 0.5% PFD+生物羊膜组、单纯生物羊膜组、丝裂霉素 C (MMC) 组和空白对照组, 每组 18 只, 均行小梁切除术, 其中 0.5% PFD+生物羊膜组在巩膜瓣下放置 0.5% PFD 溶液浸泡的生物羊膜, 单纯生物羊膜组在巩膜瓣下放置生理盐水浸泡的复水生物羊膜, MMC 组在巩膜瓣下放置浸有 MMC 的棉片 3 min 后立即采用生理盐水冲洗, 空白对照组制作巩膜瓣后不放入任何植入物。评估眼压、滤过泡及毒副作用和并发症情况, 并采用苏木精-伊红 (HE)、Masson 染色及免疫组织化学染色法观察滤过区组织病理变化。

**结果:** 小梁切除术后 14、21、28 d 各组眼压比较, 0.5% PFD+生物羊膜组 < MMC 组 < 单纯生物羊膜组 < 空白对照组 (均  $P < 0.05$ )。小梁切除术后 28 d, 0.5% PFD+生物羊膜组抗炎性增生及抑制胶原纤维增生效果最优, 滤过泡存活率最高, 且前房炎症反应轻。

**结论:** 吡非尼酮浸泡生物羊膜对兔青光眼模型有较明显的抗瘢痕作用, 且毒副作用少, 安全性好。

**关键词:** 吡非尼酮; 生物羊膜; 复方卡波姆; 青光眼模型; 小梁切除术; 滤过泡; 抗瘢痕

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.2.03

## Effect of biological amniotic membrane soaked in pirfenidone on scar formation after glaucoma filtration surgery in rabbit eyes

Zhang Shuai<sup>1</sup>, Yao Yihua<sup>2</sup>, Zheng Yangjing<sup>1</sup>, Wu Ping<sup>3</sup>, Zhu Yihua<sup>2</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81970789); Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2020J05251)

<sup>1</sup>Fuzhou Southeast Eye Hospital, Fuzhou 350008, Fujian Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology; <sup>3</sup>Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Zhu Yihua. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China. zhuyihua209@163.com

Received: 2023-09-06 Accepted: 2023-12-28

## Abstract

• **AIM:** To investigate the application of biological amniotic membrane soaked in pirfenidone (PFD) and to evaluate its anti-scarring effect and toxic side effects on glaucoma model of rabbit eyes.

• **METHODS:** The right eyes of 72 healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into 0.5% PFD + biological amniotic membrane group, biological amniotic membrane group, mitomycin C (MMC) group and blank control group after the glaucoma model was established by anterior chamber injection of compound carbomer solution, and 18 rabbits in each group underwent trabeculectomy, in which the 0.5% PFD + biological amniotic membrane group was placed with 0.5% PFD solution-soaked biological amniotic membrane under the scleral flap, and the biological amniotic membrane group was placed with normal saline-soaked rehydrated biological amniotic membrane under the scleral flap. In the MMC group, a cotton pad soaked in MMC was placed under the scleral flap for 3 min and immediately rinsed with normal saline, while the blank control group received no implant after the scleral flap was made. The intraocular pressure (IOP), filtration blebs, toxic side effects and complications were evaluated, and the histopathological changes in the filtration area were observed by hematoxylin-eosin (HE), Masson staining and immunohistochemical staining.

• **RESULTS:** The mean IOP at 14, 21 and 28 d after trabeculectomy were 0.5% PFD + biological amniotic membrane group < MMC group < biological amniotic membrane group < blank control group (all  $P < 0.05$ ). At 28 d after trabeculectomy, 0.5% PFD + biological amniotic membrane group had the best effect of anti-inflammatory hyperplasia and inhibition of collagen formation, the highest survival rate of filtration blebs, and the inflammatory reaction was mild.

• **CONCLUSION:** Biological amniotic membrane soaked in pirfenidone has more obvious anti-scarring effect on glaucoma model, with less toxic side effects and good safety.

• **KEYWORDS:** pirfenidone; biological amniotic membrane; compound carbomer; glaucoma model; trabeculectomy; filtration blebs; anti-scarring

**Citation:** Zhang S, Yao YH, Zheng YJ, et al. Effect of biological amniotic membrane soaked in pirfenidone on scar formation after glaucoma filtration surgery in rabbit eyes. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(2):189-195.

## 0 引言

青光眼滤过术是目前治疗青光眼的主要方式之一,尽管近年来青光眼滤过术有了很大进步与改良,但术后过度纤维增殖、瘢痕形成引起滤过通道堵塞而导致的手术失败仍屡见不鲜。术中应用抗增殖药物是防止青光眼滤过术后滤过通道纤维瘢痕化的重要手段<sup>[1]</sup>。临床常用的术中抗增殖药物主要有丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 和 5-氟尿嘧啶 (5-Fu)<sup>[2-3]</sup>,但这些药物的抗增殖作用持续时间较短,且局部应用所引起的术后并发症不容忽视,术后低眼压、滤过泡漏、术后感染甚至眼内炎导致失明等严重并发症时有发生<sup>[4-6]</sup>。因此,寻求一种安全有效又毒副作用小的药物或更优给药方式以延长抗增殖作用的持续时间,从而达到更高的手术成功率仍是临床上期待解决的问题。吡非尼酮 (Pirfenidone, PFD) 是一种新型的广谱抗纤维化药物,能够有效防止和控制瘢痕的形成<sup>[7]</sup>。作为一种新型小分子抗代谢药物,其具有广谱的抗炎抗纤维化作用,能抑制胶原合成,下调多种细胞因子的产生,以及阻止成纤维细胞增殖,从而达到抗瘢痕的效果<sup>[8]</sup>。Kasar 等<sup>[9]</sup>研究发现 PFD 可作为青光眼滤过术中抗增殖药物 MMC 的有效替代药物,而 Westermeyer 等<sup>[10]</sup>研究则表明 0.5% PFD 可以有效对抗青光眼滤过术后结膜的纤维化,且副作用很小,可以长期应用。羊膜作为眼科常用的生物材料,在多种角结膜眼病的治疗中应用广泛<sup>[11]</sup>。近年来,羊膜在青光眼滤过术中的应用愈发成熟<sup>[12]</sup>,而羊膜移植联合小梁切除术是其在青光眼滤过术中最常见的应用<sup>[13]</sup>,且安全性与有效性均得到很好验证<sup>[6]</sup>。然而,目前对于羊膜在青光眼滤过术中的应用研究多集中在促进上皮生长、抗炎、抗纤维化、抗菌及低免疫源性等生物学方面,而对于其机械结构相关的应用则鲜有报道,其 5 层海绵状的微观结构,使其可以像海绵一样吸附容纳一定的药物,成为优良的释药系统<sup>[14]</sup>。目前,关于 PFD 浸泡生物羊膜在青光眼滤过术中的抗瘢痕作用尚不明确,本研究拟将 PFD 浸泡生物羊膜用于兔青光眼模型滤过术中,评价其在滤过术后

的抗瘢痕效果及安全性,探讨青光眼滤过区瘢痕化治疗给药的新途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物和分组** 72 只清洁级成年同种系新西兰白兔,雌雄不限,体质量 2.5-3.0 kg,8-12 周龄,裂隙灯显微镜检查眼前节排除眼部疾病,由福建医科大学实验动物中心提供,在相同环境下适应性饲养 1 wk,动物饲养房和清洁级环境均达标准条件(湿度 40%,温度 18-25 °C,光照与黑暗时间分别是 12 h)。以右眼为实验眼,72 只实验兔全麻下右眼(72 眼)前房注入 0.3% 卡波姆溶液 0.1 mL 诱导青光眼模型,造模成功后随机分为 0.5% PFD+生物羊膜组、单纯生物羊膜组、MMC 组和空白对照组,每组实验兔 18 只 18 眼。实验遵循国家科学技术委员会发布的《实验动物管理条例》,遵从《善待实验动物的指导性意见》的相关伦理学规定,经福建医科大学附属第一医院医学伦理委员会医学研究与临床技术应用分会审核批准[批文号:闽医大附一伦理医研[2019]060 号]。

**1.1.2 主要试剂和仪器** 主要试剂:PFD 粉末(美国 Sigma 公司);生物羊膜(江西瑞济生物工程技术有限公司);卡波姆 940(山东正大福瑞达药业集团);戊巴比妥钠粉末(德国 Merck 公司),用生理盐水制成 3% 戊巴比妥钠溶液备用;MMC 粉末(日本协和发酵工业株式会社),配成 0.2 mg/mL 备用;转化生长因子(TGF)- $\beta$ 1 亲和纯化兔抗体(sc-146,美国 Santa Cruz 公司)。主要仪器:回弹式眼压计(SW500,天津索维电子科技有限公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司);裂隙灯显微镜(苏州六六视觉股份有限公司);石蜡组织包埋机与切片机(德国 Leica 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 兔青光眼模型的制备** 采用前房注射复方卡波姆溶液的方法建立兔青光眼模型<sup>[15]</sup>。将 150 mg 卡波姆 940 粉末与 12.5 mg 地塞米松磷酸钠粉末溶于 50 mL 生理盐水中,制成含 0.3% 卡波姆和 0.025% 地塞米松的复方卡波姆溶液。采用 3% 戊巴比妥钠注射液 4-5 mL 肌肉注射全麻成功后,以右眼为实验眼,于颞上方位角膜缘处用 1 mL 注射器针头进针,抽取 0.1 mL 房水然后在前房瞳孔区注入等量的 0.3% 复方卡波姆溶液,术毕氧氟沙星眼膏点眼。操作均由同一位医生完成。造模成功的标准<sup>[15]</sup>:眼压稳定升高(>22 mmHg),持续时间>1 wk 视为造模成功,期间眼压下降者可重复注射 0.3% 复方卡波姆溶液 1 次。

**1.2.2 兔青光眼模型滤过术的实施** 青光眼滤过术前取 10 mg PFD 粉末溶于 2 mL 超纯水中,制成浓度为 5 mg/mL (0.5%) PFD 溶液,将干燥生物羊膜(4 mm×5 mm)于无菌操作下浸泡于 2 mL PFD 溶液中 5-10 min。所有实验兔均在造模成功后进行小梁切除术。麻醉方法同青光眼模型的制备,无菌生理盐水冲洗后常规消毒铺巾,开睑器开睑,上直肌缝线固定,制作以穹窿部为基底的结膜瓣及 3 mm×4 mm 1/2 厚度的巩膜瓣,分离至角膜透明区内 1 mm,穿刺进入前房,缓慢放出房水,剪除约 1 mm×2 mm 相当于小梁的深层巩膜组织,并行虹膜根部切除,0.5% PFD+生物羊膜组在巩膜瓣下放置上皮层朝上 4 mm×5 mm 大小的 PFD 溶液浸泡的生物羊膜,单纯生物羊膜组在巩膜瓣下放置上皮层朝上 4 mm×5 mm 大小的生理盐水浸泡的复水生物羊膜,羊膜前端距小梁切口后缘 1 mm,10-0 尼龙线将羊膜

在巩膜瓣两角各缝合1针,MMC组在巩膜瓣下放置浸有0.2 mg/mL MMC的棉片3 min后立即采用生理盐水冲洗,空白对照组制作巩膜瓣后,不放入任何植入物,后续依次缝合巩膜瓣与结膜瓣完成手术,术后氧氟沙星眼膏涂眼。手术均由同一位医生完成。

### 1.2.3 临床观察指标

**1.2.3.1 眼压情况** 分别于造模前、造模后1、3、7、10 d,滤过术后1、3、7、14、21、28 d于清醒状态下采用回弹式眼压计测量术眼眼压,测量3次取平均值。

**1.2.3.2 滤过泡情况** 根据Kronfeld滤过泡形态和功能分型法<sup>[16]</sup>,将滤过泡分为4型:I型(微小囊泡型):薄壁、无血管、多呈微囊状;II型(扁平弥散型):扁平、弥散、苍白状、相对壁厚;III型(瘢痕型):无滤过泡,结膜充血微隆起,结膜下广泛黏连,在巩膜表面多血管外观;IV型(包裹型):局部圆顶状隆起,呈囊状增生,成为致密的球筋膜空腔。I、II型为功能性滤过泡,III、IV型无功能滤过泡,记录功能性滤过泡的生存时间。

**1.2.3.3 毒副作用和并发症情况** 滤过术后1、3、7、14、28 d采用裂隙灯显微镜检查术眼情况,观察有无结膜漏、角膜溃疡、浅前房、低眼压等并发症。为便于准确观察,将前房内炎症反应予以分级,分级标准:0级为无细胞或光斑;1级为轻度,轻度到中度细胞或光斑;2级为中度,大量细胞和光斑,但无纤维素渗出;3级为显著,纤维素渗出较多;4级为重度,纤维素渗出非常多。浅前房定义为术后1 d未形成前房或前房形成数天后又消失。前房深度分级标准<sup>[17]</sup>:浅I级,全周前房极浅,周边前房呈裂隙状小于1/5角膜厚度;浅II级:可分a、b两型,II a级:仅虹膜小环以内有极浅前房,II b级:仅瞳孔区内有极浅前房;浅III级:虹膜、晶状体全部与角膜相贴,前房完全消失。

### 1.2.4 病理学检查

**1.2.4.1 组织标本的制备** 滤过术后28 d,各组随机选取6只实验兔于耳缘静脉注射过量戊巴比妥钠溶液实施安乐死,立即摘除右眼眼球放入福尔马林液中固定48 h,剪取滤过区组织(结膜、巩膜)4 mm×2 mm后依次浸入70%、80%、95%、95%、100%、100%乙醇各40 min进行梯度脱水,并垂直角膜缘方向石蜡包埋后以4 μm厚连续切片,制成石蜡切片,4℃保存备用。

**1.2.4.2 HE染色** 取石蜡切片按照福建医科大学附属第一医院病理科标准操作流程在不同浓度二甲苯及无水乙醇中固定脱蜡后进行苏木精-伊红(HE)染色,并脱水透明树脂胶封片,在100倍光学显微镜下观察滤过区增生情况,炎症细胞为球形,成纤维细胞为长条状,细胞核蓝色深染,每张切片随机选择5个视野,计数成纤维细胞和炎症细胞数量,取平均值,拍照并记录数据。

**1.2.4.3 Masson染色** 取石蜡切片同HE染色步骤脱蜡后进行苏木精、丽春红及苯胺蓝染色,脱水透明树脂胶封片,

在100倍光学显微镜下观察胶原纤维增生情况,蓝色为胶原纤维,细胞质、肌纤维和红细胞呈红色,细胞核呈蓝褐色,拍照采集图像。

**1.2.4.4 免疫组织化学染色** 取石蜡切片同HE染色步骤脱蜡后进行磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗、抗原修复、血清封闭、滴入稀释后的兔抗兔TGF-β1多克隆抗体(工作浓度1:100),室温孵育后滴加DAB显色剂显色,并脱水透明树脂胶封片。每张切片随机选取5个视野,在400倍光学显微镜下观察TGF-β1抗原表达情况,以细胞浆显深棕色为强阳性反应,淡黄色为弱阳性反应,呈细颗粒状或弥漫性分布,拍照并采集图像,采用Image J图像分析系统获取TGF-β1阳性细胞光密度值,取平均值。

**统计学分析:**统计分析采用SPSS 20.0统计软件。服从正态分布的计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,不同时间点多组间比较采用重复测量数据的方差分析,进一步组间两两比较采用LSD-*t*检验。多组间等级资料的比较采用Kruskal-Wallis *H*检验。各组滤过泡存活率比较采用Kaplan-Meier生存分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 眼压情况** 造模前,4组实验兔右眼眼压基本一致,差异无统计学意义( $F = 0.417, P = 0.741$ )。造模后1 d,4组实验兔右眼眼压即开始升高,于造模后2、4 d分别有5、3只实验兔右眼眼压较前降低,且前房白色絮状混浊反应消失,故分别给予重复注射0.3%复方卡波姆溶液1次,继续监测所有实验兔右眼眼压,造模后10 d眼压皆可达26-31 mmHg,且4组实验兔右眼眼压基本一致,差异无统计学意义( $F = 0.107, P = 0.956$ ,表1),表明造模成功。

滤过术后1、3、7、14、21、28 d,4组实验兔右眼眼压比较,具有时间差异性、组间差异性 & 交互效应( $F_{\text{时间}} = 405.145, F_{\text{组间}} = 417.86, F_{\text{时间} \times \text{组间}} = 9.405$ ,均 $P < 0.001$ ,表2)。滤过术后1、3、7 d,4组实验兔右眼眼压比较,MMC组 $< 0.5\%$ PFD+生物羊膜组 $<$ 单纯生物羊膜组 $<$ 空白对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );滤过术后14、21、28 d,4组实验兔右眼眼压比较,0.5%PFD+生物羊膜组 $<$ MMC组 $<$ 单纯生物羊膜组 $<$ 空白对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 滤过泡情况** 滤过术后1 d,4组实验兔右眼滤过泡均呈现扁平弥散外观,而随着观察时间的延长,各组实验兔右眼滤过泡出现不同变化。0.5%PFD+生物羊膜组与MMC组于滤过术后28 d时仍可见功能性滤过泡,且0.5%PFD+生物羊膜组较MMC组隆起更明显,新生血管更少,而空白对照组与单纯生物羊膜组分别于滤过术后14、21 d变为无功能滤过泡。Kaplan-Meier生存分析曲线显示,4组实验兔右眼滤过术后滤过泡存活率具有明显统计学差异(log rank = 16.803,  $P = 0.01$ ,图1)。

表1 各组造模前后眼压比较

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

组别	眼数	造模前	造模后1 d	造模后3 d	造模后7 d	造模后10 d
0.5%PFD+生物羊膜组	18	12.61±1.65	17.67±1.08	24.00±1.33	26.06±1.39	28.56±1.29
单纯生物羊膜组	18	12.78±1.52	17.83±1.29	24.11±1.41	25.83±1.62	28.50±1.79
MMC组	18	12.33±1.33	17.61±1.28	23.56±1.20	25.78±1.06	28.33±1.68
空白对照组	18	12.83±1.38	17.89±1.23	23.83±1.29	25.56±1.46	28.61±1.42

表2 各组滤过术后眼压比较

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

组别	眼数	滤过术后 1 d	滤过术后 3 d	滤过术后 7 d	滤过术后 14 d	滤过术后 21 d	滤过术后 28 d
0.5%PFD+生物羊膜组	18	10.78±0.88 <sup>b,d,f</sup>	11.67±1.08 <sup>b,d,f</sup>	12.39±0.85 <sup>b,d,f</sup>	13.42±0.79 <sup>a,e</sup>	15.17±1.17 <sup>a,e</sup>	16.50±1.05 <sup>a,e</sup>
单纯生物羊膜组	18	12.94±1.11 <sup>b,f</sup>	13.94±0.94 <sup>b,f</sup>	15.56±0.92 <sup>b,f</sup>	17.25±1.06 <sup>a,e</sup>	18.50±1.05 <sup>a,e</sup>	20.83±0.75 <sup>a,e</sup>
MMC组	18	9.78±0.94 <sup>b</sup>	10.39±0.70 <sup>b</sup>	11.33±0.91 <sup>b</sup>	14.50±1.17 <sup>a</sup>	17.00±1.41 <sup>a</sup>	18.33±1.03 <sup>a</sup>
空白对照组	18	13.89±1.02	15.22±1.00	16.67±0.97	19.08±1.00	21.67±1.21	25.50±1.05

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组;<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 单纯生物羊膜组;<sup>e</sup> $P < 0.05$ ,<sup>f</sup> $P < 0.01$  vs MMC组。

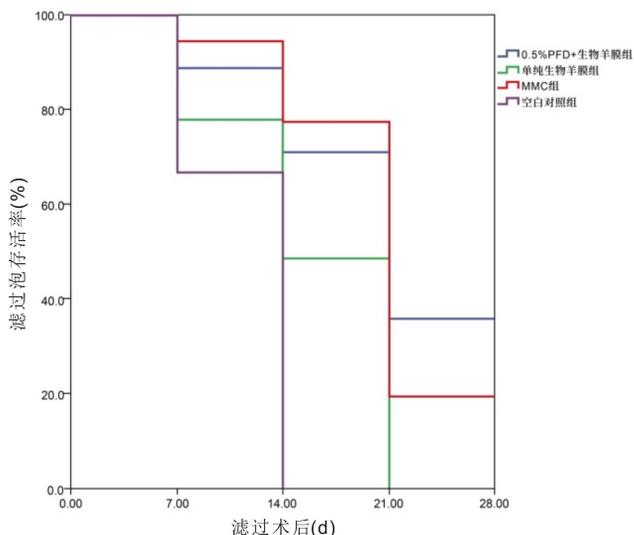


图1 各组滤过术后滤过泡的Kaplan-Meier生存分析曲线。

**2.3 毒副作用和并发症情况** 滤过术后 28 d 内,4 组实验兔右眼结膜均可见不同程度的充血及角膜混浊与水肿,但均未出现明显的结膜漏、角膜溃疡及浅前房等并发症,前房存在不同程度的炎症反应,各组间炎症反应情况差异无统计学意义( $H = 2.250, P = 0.522$ ,表 3)。

**2.4 病理学检查情况** HE 染色结果显示,滤过术后 28 d,4 组实验兔右眼滤过区炎症细胞和成纤维细胞数量差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ,图 2,表 4),其中 0.5%PFD+生物羊膜组实验兔右眼滤过区成纤维细胞和炎症细胞数量均较单纯生物羊膜组、MMC 组与空白对照组更少,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );单纯生物羊膜组与 MMC 组、空白对照组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );MMC 组与空白对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

Masson 染色结果显示,滤过术后 28 d,0.5%PFD+生物羊膜组实验兔右眼滤过区可见中等量的胶原纤维增生,颜色浅,胶原之间排列整齐;单纯生物羊膜组可见大量胶原纤维组织增生,颜色深,胶原之间排列密集;MMC 组可见较多量胶原纤维增生,颜色略深,胶原之间排列仍规则,稍紧密;空白对照组可见大量胶原纤维增生,颜色深,胶原纤维紊乱排列,并形成密集瘢痕(图 2)。

免疫组织化学染色结果显示,滤过术后 28 d,0.5%PFD+生物羊膜组实验兔右眼滤过区着染 TGF- $\beta 1$  细胞浆面积小,颜色浅;单纯生物羊膜组可见较多量细胞浆着染 TGF- $\beta 1$ ,颜色深;MMC 组可见细胞浆中等量着染 TGF- $\beta 1$ ,颜色较深;空白对照组可见细胞浆大量着染 TGF- $\beta 1$ ,颜色深。4 组实验兔右眼滤过区 TGF- $\beta 1$  阳性细胞光密度值差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,图 2,表 4),其中 0.5%PFD+生物羊膜组实验兔右眼滤过区 TGF- $\beta 1$  阳性细胞光密度值较单纯生物羊膜组、MMC 组与空白对照组更

表3 滤过术后 28 d 内各组前房炎症反应情况比较 眼

组别	眼数	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级
0.5%PFD+生物羊膜组	18	13	3	2	0	0
单纯生物羊膜组	18	12	3	3	0	0
MMC 组	18	8	3	3	2	2
空白对照组	18	9	3	3	1	2

表4 滤过术后 28 d 各组滤过区炎症细胞和成纤维细胞数及 TGF- $\beta 1$  阳性细胞光密度比较  $\bar{x} \pm s$

组别	炎症细胞及成纤维细胞(个/高倍视野)	TGF- $\beta 1$ 阳性细胞光密度值
0.5%PFD+生物羊膜组	30.00±3.16 <sup>b,d,e</sup>	0.314±0.013 <sup>b,d,e</sup>
单纯生物羊膜组	47.80±7.01 <sup>b,e</sup>	0.374±0.011 <sup>a,f</sup>
MMC 组	38.60±5.01 <sup>b</sup>	0.331±0.010 <sup>b</sup>
空白对照组	62.00±6.96	0.393±0.012
$F$	28.178	49.987
$P$	<0.001	<0.001

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组;<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 单纯生物羊膜组;<sup>e</sup> $P < 0.05$ ,<sup>f</sup> $P < 0.01$  vs MMC 组。

小,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );单纯生物羊膜组与 MMC 组、空白对照组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );MMC 组与空白对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

### 3 讨论

研究表明,青光眼滤过术后滤过通道堵塞的主要原因是滤过区成纤维细胞持续增殖,以葡萄糖胺聚糖和胶原为主的细胞外基质的形成与沉积,导致结膜下组织纤维发生瘢痕化,最终引起滤过术所建立的外引流通道变得狭窄甚至完全关闭<sup>[18]</sup>。而 TGF- $\beta$ 、血小板衍生生长因子(PDGF)和血管内皮生长因子(VEGF)等细胞因子的过度表达在青光眼滤过术后瘢痕形成过程中扮演关键作用,这些细胞因子可以诱导成纤维细胞的活化与增殖,并向受损组织迁移,导致纤维化的产生<sup>[19]</sup>。Zhu 等<sup>[20]</sup>研究通过分离青光眼滤过术后结膜囊成纤维细胞进行培养,证实 TGF- $\beta$  可促进成纤维细胞过度活化,导致细胞增殖、迁移和细胞外基质合成,瘢痕出现,而通过对 TGF- $\beta$  进行调控则可抑制其对成纤维细胞的激活作用。Millá 等<sup>[21]</sup>发现青光眼滤过术后滤过区增殖明显的患者结膜囊成纤维细胞培养液中 VEGF 与 TGF- $\beta$  浓度比正常人明显升高。而 Sun 等<sup>[22]</sup>发现在青光眼滤过术后结膜下注射抗 VEGF 药物康柏西普可提高滤过泡存活率。因此,通过抑制 TGF- $\beta$ 、PDGF 及 VEGF 等细胞因子进而抑制成纤维细胞增殖和向受损组织迁移将减少纤维化及瘢痕的形成,达到抗青光眼滤过术后滤过区瘢痕化的效果。临床实践与研究发现,建立青

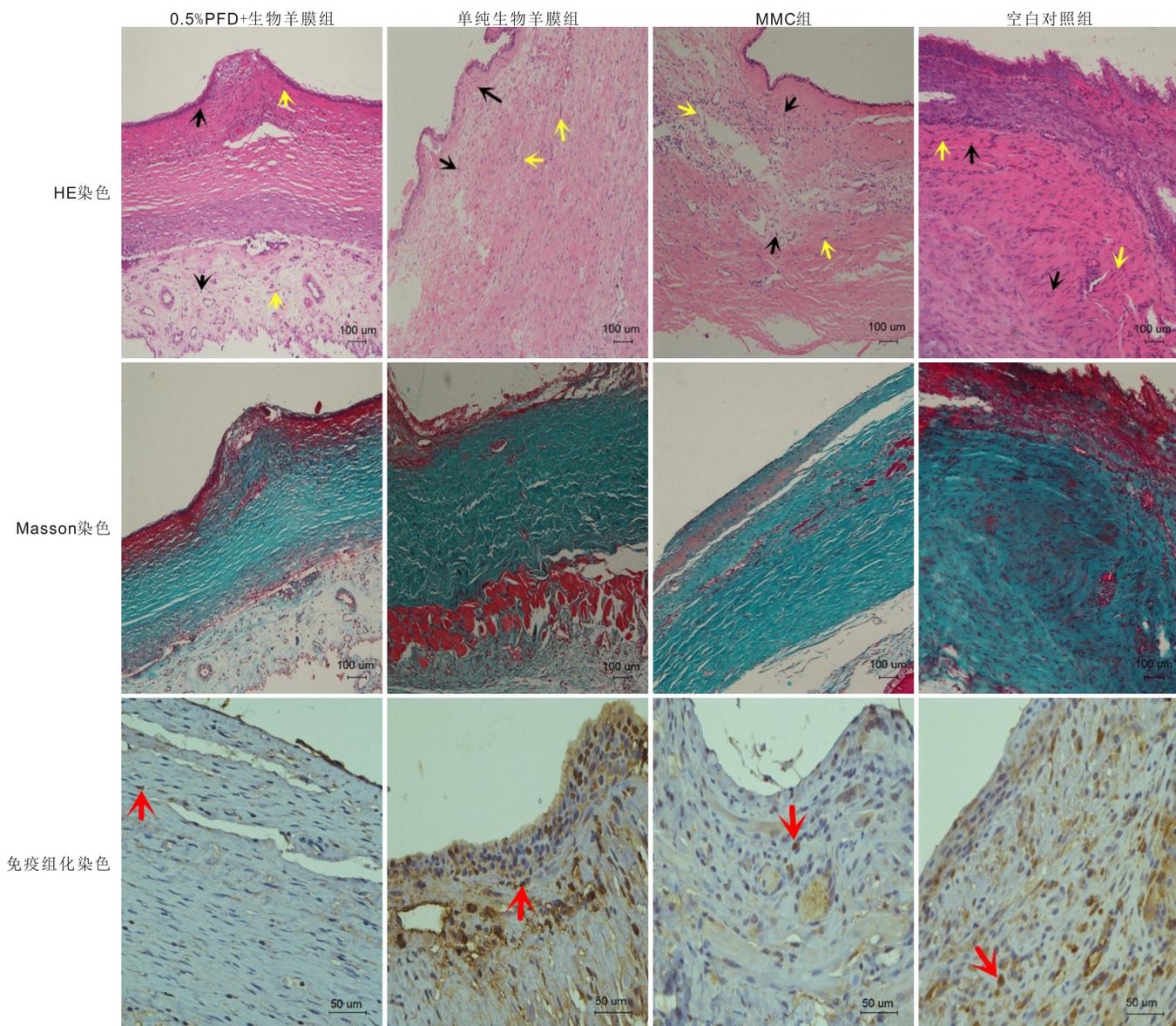


图2 各组滤过术后 28 d 滤过区病理变化 黑箭头示炎症细胞,黄箭头示成纤维细胞,红箭头示 TGF- $\beta$ 1 阳性细胞。

光眼滤过术的实验模型有助于了解术后切口愈合过程,进而揭示瘢痕形成的原因,而兔是青光眼滤过术实验模型最常用的动物,因其角膜平均水平径与人眼非常接近,可以在兔眼上进行与人眼一样的青光眼滤过术<sup>[23]</sup>,且在滤过术中或术后应用抗增殖药物、滤过术中在结膜瓣与巩膜瓣下植入生物材料机械隔离滤过区结膜与巩膜及对给药方式进行改良让抗增殖药物在滤过区存留时间尽可能延长是对抗青光眼滤过术后滤过区瘢痕形成的有效措施<sup>[19]</sup>。故本实验对兔进行青光眼造模后施行经典的小梁切除术,观察青光眼滤过术后眼压、滤过泡、毒副作用及并发症等指标,并对滤过区组织进行病理检查<sup>[24]</sup>。

PFD 作为有效的细胞因子抑制剂,其可通过下调肝、肾、肺等多种器官纤维化过程中成纤维细胞生长因子(bFGF)、TGF- $\beta$ 、结缔组织生长因子(CTGF)、PDGF等多种细胞因子的活化与表达,从而降低成纤维细胞的生物学活性,引起基质胶原合成被抑制与细胞增殖的减少,进而发挥抗瘢痕作用<sup>[25-31]</sup>,并可通过抑制白介素(IL)-6等炎症介质及肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 的分泌发挥抗炎效果<sup>[32]</sup>。PFD 还可通过抑制 I 型与 III 型胶原蛋白的表达达到抗纤维化的作用<sup>[33]</sup>。特发性肺纤维化是其目前主要临

床适应证,研究亦证实 PFD 对心脏、肾脏及肝脏的纤维化和多发性硬化症等纤维化疾病有较好的疗效<sup>[29]</sup>。在眼科领域,PFD 也被证实可通过上述途径发挥其优良的抗纤维化作用<sup>[34]</sup>。陈旭等<sup>[35]</sup>进行的体外实验结果显示,通过下调 TGF- $\beta$ /Smad 通路中 TGF- $\beta$ 3 的表达,PFD 可以抑制兔 Tenons 囊成纤维细胞增殖。Jung 等<sup>[36]</sup>将 PFD 应用于 Ahmed 青光眼引流阀植入术后的兔眼,通过对滤过泡组织进行 HE 染色、Masson 染色及免疫组织化学染色发现 PFD 可以抑制 TGF- $\beta$  及 CTGF 的活化,减少胶原沉积,并提出 PFD 可作为青光眼术后抗增殖的有效手段。Sun 等<sup>[37]</sup>对兔眼局部使用 PFD 后发现 0.5% 的 PFD 是一个比较安全有效的浓度。Zhong 等<sup>[38]</sup>发现在兔青光眼模型滤过术后滴用 0.5% 的 PFD 滴眼液可提高小梁切除术后滤过泡的存活率,进一步证明 PFD 可能成为青光眼滤过术中有效且安全的抗瘢痕药物。

羊膜存在于胎盘的最内层,薄且透明,不含神经、血管和淋巴组织,不产生明显免疫源性,无同种异体排斥反应,组织相容性高,故具有良好的安全性<sup>[39]</sup>。得益于冷冻与干燥技术的发展,羊膜的获取变得更加容易,价格也更加低廉,且在保证其生物、物理和组织学特性的条件下,羊膜

还可以进行长时间保存<sup>[40]</sup>。羊膜的多层细胞结构与富含的多种细胞因子使其具有抗炎、抗瘢痕、抗菌及促进组织再生修复等优良特性<sup>[41-42]</sup>。因此,将羊膜应用于青光眼小梁切除术中,达到了良好的抗瘢痕效果。本研究结果显示,与空白对照组相比,单纯生物羊膜组滤过泡存活率提高,可维持更低的术后眼压,减轻炎症细胞与成纤维细胞增生,抑制 TGF- $\beta$ 1 表达,减少青光眼滤过术后滤过区胶原纤维的沉积,且对组织刺激性小,毒副作用轻,无明显并发症,安全性高。Yadava 等<sup>[43]</sup>在原发性青光眼患者小梁切除术中植入羊膜并进行为期 1 a 的随访观察,发现羊膜组在维持更低的眼压、提高滤过泡存活率方面有明显优势,且无明显并发症。

在电子显微镜下可见羊膜由上皮细胞层、基底膜、致密层、成纤维细胞层和海绵层构成,而网状纤维和胶原纤维布满基底膜,这些纤维之间相互缠绕形成网状结构,网孔之间直径大小约为 0.5-15  $\mu\text{m}$ <sup>[6]</sup>,类似海绵结构,故可以像海绵一样吸附定量的药液,容纳定量的药物,成为一种“药库”,任何直径小于羊膜网孔的微粒物质均能储存其中。由于杰出的组织支架作用,生物羊膜在口腔和牙周手术、眼科、心脏等领域已经得到广泛应用<sup>[14]</sup>。Zou 等<sup>[44]</sup>曾将 PFD 与 5-500 nm 的纳米颗粒脂质体相结合制成平均粒径为 346.6 $\pm$ 62.21 nm 的 PFD 脂质体,故将生物羊膜浸泡于 0.5% 的 PFD 溶液中,羊膜将会包含一定量的 PFD。Ling 等<sup>[45]</sup>研究描述了生物羊膜在 PBS 中降解的过程,从第 1 wk 到第 4 wk,生物羊膜重量逐渐减少至 8%,且胶原纤维不断变薄,密度不断降低,最后微绒毛丢失,失去结构的完整性,呈现出空心与多孔的外观,表明随着时间推移,其微观结构可逐渐降解,故储存于纤维支架内的药物颗粒可以被逐渐释放,是一个持续而缓慢的动态过程。研究发现,青光眼术后约 14 d,羊膜将于巩膜组织内溶解,对羊膜进行交联,则可延长羊膜的溶解时间<sup>[46]</sup>,而青光眼滤过术后滤过区瘢痕形成通常在术后 14 d<sup>[47]</sup>。本研究中,单纯生物羊膜组、MMC 组与空白对照组三组眼压在滤过术后 14 d 后升高幅度较大,这与切口的瘢痕愈合机制有关,切口在滤过术后约 14 d 愈合,瘢痕形成,其后滤过通道不断被堵塞,故随着时间延长眼压出现明显升高,而 0.5% PFD  $\pm$  生物羊膜组在术后各观察时间点眼压变化较平稳,波动较小,能在更长时间保持更低的眼压,提示储存于羊膜组织中的 PFD 可随着羊膜胶原纤维的逐渐降解而被缓慢地释放出来,在术后瘢痕形成期内不断维持局部有效的药物浓度,效果优于一次性给药。Zhang 等<sup>[48]</sup>通过 2 a 时间随访观察 5-Fu 浸泡生物羊膜联合小梁切除术在原发性开角型青光眼患者中的疗效发现,5-Fu 浸泡生物羊膜可以长时间维持滤过通道的通畅、降低术后眼压、减轻相关并发症,从而提高小梁切除术的成功率,这与本研究方法大致相同,不同之处在于生物羊膜负载药物不同,但研究结果基本相似。

此外,本研究进行组织病理检查结果证明,0.5% PFD 浸泡生物羊膜组可以在兔青光眼模型滤过术后一定时间内抑制滤过区胶原纤维的沉积,维持滤过通道的开放,具有明显且持久的抗瘢痕作用。Fayzullin 等<sup>[49]</sup>在动物实验中将聚乳酸和 PFD 结合制成药物输送系统并通过 HE 染色与免疫组织化学染色等方法观察到持续的抗纤维化作用,本研究也用类似方法得出相同结论。本研究还发现

0.5% PFD 浸泡生物羊膜对兔眼组织刺激性小,毒副作用少,无明显并发症,安全性高,这与 Zhong 等<sup>[38]</sup>关于 PFD 对兔眼的毒性反应研究结果相一致。

综上所述,本研究发现 PFD 浸泡生物羊膜在兔青光眼模型滤过术后的抗瘢痕效果是多重的,其既可以利用羊膜的物理学特性机械隔离滤过区结膜与巩膜起到机械屏障的抗纤维化作用,又能够通过羊膜自带的多种细胞因子而发挥抗炎、抗瘢痕的生物学特性,还可以利用羊膜的组织学特性成为一种优良的缓释系统,以增加抗瘢痕药物在局部的存留时间,达到持久的抗瘢痕效果。这种将抗瘢痕药物与缓释系统相结合的方法有望成为青光眼滤过术后抗瘢痕治疗的新方向与新希望。然而,该方法的长期疗效和安全性及更优的给药组合还需要更多的实验与研究证实,如通过交联的方式延长羊膜的降解时间,通过纳米技术将 PFD 制成更稳定安全的脂质体,并进行多中心、大样本的临床试验进一步确定其在临床实践中的作用。

#### 参考文献

- [1] Kozdon K, Caridi B, Duru I, et al. A Tenon's capsule/bulbar conjunctiva interface biomimetic to model fibrosis and local drug delivery. *PLoS One*, 2020,15(11):e0241569.
- [2] Fan Gaskin JC, Kong RCK, Shah MH, et al. Inhibitory effects of 3', 4'-dihydroxyflavonol in a mouse model of glaucoma filtration surgery and TGF $\beta$ 1-induced responses in human Tenon's fibroblasts. *Trans Vis Sci Tech*, 2022,11(8):18.
- [3] Bell K, de Padua Soares Bezerra B, Mofokeng M, et al. Learning from the past: Mitomycin C use in trabeculectomy and its application in bleb-forming minimally invasive glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol*, 2021,66(1):109-123.
- [4] Moon S, Kim J, Lee J. Comparison of the intrableb characteristics of anterior segment optical coherence tomography imaging in trabeculectomy according to amniotic membrane transplantation. *Ophthalmic Res*, 2023,66(1):993-1005.
- [5] Mohammad-Rabei H, Moravej R, Almasi-Nasrabadi M, et al. Effect of mitomycin-C on corneal endothelial cell parameters after refractive surface ablation procedures. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*, 2022,10(4):156-164.
- [6] Shen TY, Hu WN, Cai WT, et al. Effectiveness and safety of trabeculectomy along with amniotic membrane transplantation on glaucoma: a systematic review. *J Ophthalmol*, 2020,2020:3949735.
- [7] Palathingal Bava E, George J, Tarique M, et al. Pirfenidone increases IL-10 and improves acute pancreatitis in multiple clinically relevant murine models. *JCI Insight*, 2022,7(2):e141108.
- [8] Jin J, Togo S, Kadoya K, et al. Pirfenidone attenuates lung fibrotic fibroblast responses to transforming growth factor- $\beta$ 1. *Respir Res*, 2019,20(1):119.
- [9] Kasar K, Demir T, Akin MM, et al. The effect of halofuginone and pirfenidone on wound healing in experimental glaucoma filtration surgery. *J Fran Ophthalmol*, 2021,44(3):340-349.
- [10] Westermeyer HD, Salmon B, Baynes R, et al. Safety and efficacy of topically applied 0.5% and 1% pirfenidone in a canine model of subconjunctival fibrosis. *Vet Ophthalmol*, 2019,22(4):502-509.
- [11] Röck T, Bartz-Schmidt KU, Landenberger J, et al. Amniotic membrane transplantation in reconstructive and regenerative ophthalmology. *Ann Transplant*, 2018,23:160-165.
- [12] Sharma R, Nappi V, Empeslidis T. The developments in amniotic membrane transplantation in glaucoma and vitreoretinal procedures. *Int Ophthalmol*, 2023,43(5):1771-1783.
- [13] Walkden A. Amniotic membrane transplantation in ophthalmology:

an updated perspective. Clin Ophthalmol, 2020,14:2057–2072.

- [14] Leal–Marin S, Kern T, Hofmann N, et al. Human Amniotic Membrane: a review on tissue engineering, application, and storage. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2021,109(8):1198–1215.
- [15] 庞国龙, 于菲菲, 孙河. 复方卡波姆构建高血压模型的视网膜形态学改变. 国际眼科杂志, 2018,18(2):231–234.
- [16] Jang YK, Choi EJ, Son DO, et al. Filtering bleb size in the early postoperative period affects the long–term surgical outcome after trabeculectomy. Korean J Ophthalmol, 2023,37(1):53–61.
- [17] Pan CW, Qian YX, Li J, et al. Iris surface features and anterior chamber depth in Chinese adolescents. BMC Ophthalmol, 2020, 20(1):379.
- [18] Wang L, Guo DD, Wang Z, et al. Zinc oxide nanoparticles induce human tenon fibroblast apoptosis through reactive oxygen species and caspase signaling pathway. Arch Biochem Biophys, 2020,683:108324.
- [19] Shao CG, Sinha NR, Mohan RR, et al. Novel therapies for the prevention of fibrosis in glaucoma filtration surgery. Biomedicines, 2023, 11(3):657.
- [20] Zhu HR, Dai L, Li XB, et al. Role of the long noncoding RNA H19 in TGF– $\beta$ 1–induced Tenon’s capsule fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition. Exp Cell Res, 2020,387(2):111802.
- [21] Millá E, Ventura–Abreu N, Vendrell C, et al. Differential gene and protein expression of conjunctival bleb hyperfibrosis in early failure of glaucoma surgery. Int J Mol Sci, 2023,24(15):11949.
- [22] Sun ZH, Li SS, Wang W, et al. Treatment of filtration bleb dysfunction after glaucoma surgery by needle revision of filtration bleb combined with conbercept. Medicine, 2023,102(34):e34591.
- [23] Chong RS, Crowston JG, Wong TT. Experimental models of glaucoma filtration surgery. Acta Ophthalmol, 2021,99(1):9–15.
- [24] 张帅. 吡非尼酮浸泡生物羊膜抗兔青光眼滤过术后瘢痕化作用的实验研究. 福建医科大学, 2016.
- [25] 廖丁莹, 付丽丽, 郑玉萍, 等. 吡非尼酮对内皮细胞间质转化的抑制作用及机制. 国际眼科杂志, 2021,21(2):204–210.
- [26] Aimo A, Spitaleri G, Panichella G, et al. Pirfenidone as a novel cardiac protective treatment. Heart Fail Rev, 2022,27(2):525–532.
- [27] Graziani F, Varone F, Crea F, et al. Treating heart failure with preserved ejection fraction: learning from pulmonary fibrosis. Eur J Heart Fail, 2018,20(10):1385–1391.
- [28] Meyer FEU, Santos GL, Doan TP, et al. Pirfenidone affects human cardiac fibroblast proliferation and cell cycle activity in 2D cultures and engineered connective tissues. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2023,396(8):1687–1699.
- [29] Sartiani L, Bartolucci G, Pallecchi M, et al. Pharmacological basis of the antifibrotic effects of pirfenidone: Mechanistic insights from cardiac *in–vitro* and *in–vivo* models. Front Cardiovasc Med, 2022, 9:751499.
- [30] Morfino P, Aimo A, Castiglione V, et al. Treatment of cardiac fibrosis: from neuro–hormonal inhibitors to CAR–T cell therapy. Heart Fail Rev, 2023,28(2):555–569.
- [31] Wang JQ, Wang X, Qi XY, et al. The efficacy and safety of pirfenidone combined with immunosuppressant therapy in connective tissue disease–associated interstitial lung disease: a 24–week prospective controlled cohort study. Front Med, 2022,9:871861.
- [32] Aimo A, Cerbai E, Bartolucci G, et al. Pirfenidone is a

cardioprotective drug: mechanisms of action and preclinical evidence. Pharmacol Res, 2020,155:104694.

- [33] Al–Kuraishy HM, Batiha GES, Faidah H, et al. Pirfenidone and post–Covid–19 pulmonary fibrosis: invoked again for realistic goals. Inflammopharmacology, 2022,30(6):2017–2026.
- [34] Wu SB, Hou TY, Kau HC, et al. Effect of pirfenidone on TGF– $\beta$ 1–induced myofibroblast differentiation and extracellular matrix homeostasis of human orbital fibroblasts in Graves’ ophthalmopathy. Biomolecules, 2021,11(10):1424.
- [35] 陈旭, 申颖, 赵海霞, 等. 吡非尼酮通过下调 TGF– $\beta$ /Smad 通路中 TGF– $\beta$ 3 的表达抑制兔 Tenons 囊成纤维细胞增殖. 南方医科大学学报, 2021,41(11):1692–1699.
- [36] Jung KI, Park CK. Pirfenidone inhibits fibrosis in foreign body reaction after glaucoma drainage device implantation. Drug Des Devel Ther, 2016,10:1477–1488.
- [37] Sun G, Lin X, Zhong H, et al. Pharmacokinetics of pirfenidone after topical administration in rabbit eye. Mol Vis, 2011,17:2191–2196.
- [38] Zhong H, Sun G, Lin X, et al. Evaluation of pirfenidone as a new postoperative antiscarring agent in experimental glaucoma surgery. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011,52(6):3136–3142.
- [39] Munoz–Torres JR, Martínez–González SB, Lozano–Luján AD, et al. Biological properties and surgical applications of the human amniotic membrane. Front Bioeng Biotechnol, 2023,10:1067480.
- [40] Elkhenany H, El–Derby A, Abd Elkodous M, et al. Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred–year challenge. Stem Cell Res Ther, 2022,13(1):8.
- [41] 田鹏飞, 何坤, 祝寿辉, 等. 生物羊膜覆盖联合角膜绷带镜治疗眼表化学性烧伤. 国际眼科杂志, 2023,23(1):167–171.
- [42] Chen P, Lu MJ, Wang T, et al. Human amniotic membrane as a delivery vehicle for stem cell–based therapies. Life Sci, 2021, 272:119157.
- [43] Yadava U, Jaisingh K, Dangda S, et al. Simultaneous use of amniotic membrane and Mitomycin C in trabeculectomy for primary glaucoma. Indian J Ophthalmol, 2017,65(11):1151–1155.
- [44] Zou XM, Li TT, Mao YX, et al. Multifunctional drug–loaded phase–change nanoparticles inhibit the epithelial–mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma by affecting the activity of activated hepatic stellate cells. Biomed Res Int, 2022,2022:6441179.
- [45] Ling KE, Roslan SM, Taib H, et al. Biodegradability of amniotic membrane as potential scaffold for periodontal regeneration. Cureus, 2023,15(9):e45394.
- [46] Zhang CM, Du TT, Mu GY, et al. Evaluation and ultrastructural changes of amniotic membrane fragility after UVA/riboflavin cross–linking and its effects on biodegradation. Medicine, 2020, 99(20):e20091.
- [47] Wang RQ, Chen BY, Wei HY, et al. Collecting and deactivating TGF– $\beta$ 1 hydrogel for anti–scarring therapy in post–glaucoma filtration surgery. Mater Today Bio, 2022,14:100260.
- [48] Zhang CM, Wu M, Wang JR, et al. Use of 5–fluorouracil–soaked bioamniotic membranes in trabeculectomy for primary open–angle glaucoma: a retrospective analysis. J Ophthalmol, 2017,2017:2698975.
- [49] Fayzullin A, Churbanov S, Ignatieva N, et al. Local delivery of pirfenidone by PLA implants modifies foreign body reaction and prevents fibrosis. Biomedicines, 2021,9(8):853.