

曲安奈德抑制 BN 大鼠脉络膜新生血管生长

高小燕¹, 何守志²

基金项目: 全军“十五”科研基金资助项目(No. 02M014)
作者单位: ¹(100144) 中国北京市, 北方工业大学医院眼科;
²(100853) 中国北京市, 中国人民解放军总医院眼科
作者简介: 高小燕, 博士, 主治医师, 研究方向: 老年黄斑变性。
通讯作者: 高小燕. aprilswallow@ sina. com
收稿日期: 2010-05-17 修回日期: 2010-07-13

Triamcinolone acetonide suppress CNV growing of BN rat

Xiao-Yan Gao¹, Shou-Zhi He²

Foundation item: PLA Science and Technique Foundation during the 10th Five-Year Plan Period(No. 02M014)

¹Department of Ophthalmology, North Industry University Hospital, Beijing 100144, China; ²Department of Ophthalmology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Xiao-Yan Gao. Department of Ophthalmology, North Industry University Hospital, Beijing 100144, China. aprilswallow@ sina. com

Received: 2010-05-17 Accepted: 2010-07-13

Abstract

• **AIM:** To observe the inhibition of krypton induced choroidal neovascularization (CNV) of brown norway (BN) rat by intravitreal triamcinolone acetonide (TA) injection after photocoagulation, and to study the mechanism of inhibition of CNV growth.

• **METHODS:** Thirty-six healthy BN rats were divided randomly to two groups, one eye was chosen randomly as experimental eye. After establishing BN rat CNV model, 8 μ L (320 μ g) TA was injected in vitreous immediately after photocoagulation in treatment group, the same volume isotonic balanced salt solution (BSS) was injected in vitreous in the contrast group. Eyes of 6 BN rats were enucleated for histological slices in 1 week, 2, 4 weeks. The protein expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), factor VIII-related antigen (F VIII-RAg) was examined by immunohisto-chemical method, and the transcription of vascular endothelial growth factor mRNA (VEGFmRNA) was Examined by *in situ* hybridization, meanwhile semiquantitative analysis was conducted.

• **RESULTS:** In treatment group, the positive stain optical density of NF- κ B, MCP-1, F VIII-RAg, and VEGFmRNA was obviously lower the contemporaneous control group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** TA can lower the expression of VEGF mRNA transcription and the protein expression of NF- κ B, MCP-1 and F VIII-RAg, so it can effectively inhibit the development of BN rat CNV, which indicates that TA is an effective drug to treat CNV.

• **KEYWORDS:** triamcinolone acetonide; choroidal neovascularization; nuclear factor-kappa B; monocyte chemoattractant protein-1; vascular endothelial growth factor; factor VIII-related antigen; integrated optical density

Gao XY, He SZ. Triamcinolone acetonide suppress CNV growing of BN rat. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010; 10 (8): 1493-1496

摘要

目的: 观察光凝后即刻玻璃体腔内注射曲安奈德 (triamcinolone acetonide, TA) 对 BN 大鼠脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 生长的抑制作用机制。

方法: 健康 BN 大鼠 36 只随机分为两组, 随机抽取一眼作为实验眼。建立 BN 大鼠 CNV 动物模型。光凝后的即刻行玻璃体腔内注射 TA 8 μ L (320 μ g), 对照组则在光凝眼行玻璃体腔内注射 BSS 8 μ L。分别在光凝后 1, 2, 4wk 各处死动物 6 只, 摘除眼球, 制作石蜡切片, 利用光镜观察不同时间点的 CNV 的变化。利用免疫组化的方法对 NF- κ B, MCP-1 和 F VIII-RAg 蛋白的表达进行半定量检测, 并用原位杂交法检测 VEGF 的基因表达, 并行半定量检测。

结果: 实验 1, 2, 4wk, 与对照组相比 NF- κ B, MCP-1 和 F VIII-RAg 蛋白表达及 VEGF 的基因表达明显降低 ($P < 0.05$)。

结论: TA 能够降低 NF- κ B, MCP-1 等的表达和 VEGF 的转录, 故 TA 是治疗 CNV 的一种有效的药物。

关键词: 曲安奈德; 脉络膜新生血管; 核因子- κ B; 单核细胞趋化蛋白-1; 血管内皮生长因子; VIII因子相关抗原; 积分光密度

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2010. 08. 013

高小燕, 何守志. 曲安奈德抑制 BN 大鼠脉络膜新生血管生长. 国际眼科杂志 2010; 10(8): 1493-1496

0 引言

人们对湿性 ARMD 所致的 CNV 的治疗方法做了大量临床和实验研究, 目前尚无确切疗法, 主要有激光光凝、玻璃体手术切除 CNV 和放射治疗。这些方法不可避免地有损伤健康组织的潜在危险。药物治疗方法如皮质类固醇^[1]、抗血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶抑制剂、脱氧氟尿嘧啶核苷和烟曲霉素类似物等正逐渐引起人们关注, 其疗效有待进一步临床观察。我们仅采用光凝后即刻 BN 大鼠玻璃体腔内注射曲安奈德 (TA) 的方法来探讨该药对激光光凝诱导的 CNV 的发生发展的抑制作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 氩激光机 (美国 Coherent 公司, 型号 Novua 2000); Topcon OMS-300 型眼科手术显微镜; 微量进样器 (25 μ L) (上海安亭微量进样器厂); Image-ProPlus 5.1 图像分析系统 (美国 Media cybernetics 公司)。TA 注射液

(1mL:40mg)(昆明积大制药有限公司);兔抗人 FVIII-RAg-mAb(北京中杉金桥生物技术有限公司);兔抗大鼠 MCP-1 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);小鼠抗大鼠的 NF-κBmAb 0.1mL(北京中杉金桥生物技术有限公司);即用型 SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);SP-9002 免疫组化染色试剂盒;VEGF 原位杂交检测试剂盒。

1.2 方法 健康雄性 BN 大鼠 36 只,体质量 200~220g,随机分为两组,实验组和对照组。复方托品酰胺滴眼液双眼散瞳,左下 ip 100g/L 水合氯醛溶液 3.0mL/kg 麻醉,检查双眼前节和眼底均正常。随机选取 1 眼作实验眼,滴 10g/L 甲基纤维素后,依照赵世红等^[2]的方法建立 CNV 动物模型,另 1 眼不光凝为正常眼。全身麻醉状态下,丁卡因滴眼液表面麻醉后,手术显微镜下,30G 针头颞侧角膜缘后 0.5mm 作一穿刺口,微量注射器从穿刺口进针,大约为 1.5mm 深,针尖朝向视神经方向,玻璃体中可见针尖,缓缓注入 TA 8μL(320μg),由散大的瞳孔可观察到玻璃体中 TA 的白色混悬液体,轻轻拔针后,显微镊子轻夹穿刺口片刻,以利穿刺口闭合。对照组 BN 大鼠玻璃体内注射同样容量的等渗的 BSS 液。因注射造成晶状体损伤的眼均被排除实验。光凝后在 1,2,4wk 观察各实验指标,每组大鼠 6 只。深度麻醉下摘除眼球,DEPC 处理过的蒸馏水冲洗,置于 40g/L PFA-0.1mol/L PBS-DEPC 液中固定 2h。按病理组织学方法梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋,蜡块 4℃ 保存备用。眼球组织 5μm 厚度连续切片,置于 50℃ DEPC 处理过的蒸馏水中展片,捞片,置烤箱 37℃ 烤片 12h 后,4℃ 保存,备用做 HE 染色、免疫组化及原位杂交检测。

1.2.1 MCP-1, NF-κB 及 FVIII-RAg 表达的检测 石蜡切片,常规脱蜡至水;30mL/L H₂O₂ 室温孵育 10min,阻断内源性过氧化物酶活性,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5min;切片置于盛有 0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液的抗原修复盒中,微波中火加热 15min 进行抗原微波炉热修复,自然冷却 30min;滴加 50g/L BSA 封闭液,室温 20min。滴加一抗兔抗大鼠 MCP-1 多克隆抗体(1:70),4℃ 过夜;滴加生物素化山羊抗兔 IgG(二抗),37℃ 孵育 20min;滴加 SABC,37℃ 孵育 20min;滴加 AEC,室温显色,镜下控制反应时间(3~10min),蒸馏水充分洗涤;苏木素轻度衬染 10s,自来水充分水洗,水溶性封片剂封片。另组织切片脱蜡至水,滴加封闭用正常山羊血清工作液,室温孵育 15min;滴加一抗小鼠抗大鼠的 NF-κBmAb(1:70),4℃ 过夜;滴加生物素化二抗-生物素标记山羊抗小鼠 IgG,室温孵育 15min;滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液,37℃ 孵育 40min;余同 MCP-1。另抗原修复采用滴加 1g/L 胰酶消化液,室温 10min;滴加 50g/L BSA 封闭液,室温 20min;滴加一抗兔抗人 FVIII-RAgmAb(1:100),4℃ 过夜;余同 MCP-1。用 0.01mol/L PBS 取代一抗孵育,作为阴性对照,试剂盒中已知阳性切片作为阳性对照。切片内被染成红色的点、团簇为阳性反应物。

1.2.2 VEGF 表达的检测 石蜡切片常规脱蜡至 DEPC-H₂O;30mL/L H₂O₂ 室温 10min,灭活内源性酶;切片上滴加 30g/L 胃蛋白酶室温消化 10min,暴露 mRNA 片段;滴加预杂交液 20μL,于含 200mL/L 甘油 20mL 的杂交湿盒中 40℃ 预杂交 3h;滴加含 VEGF 寡核苷酸标记探针的杂交液 20μL,原位杂交专用盖玻片盖在玻片上,置湿盒中于 42℃ 杂交 18h;滴加封闭液,37℃ 30min;滴加生物素化鼠

表 1 FVIII-RAg, VEGFmRNA 表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

时间 t/wk	FVIII-RAg		VEGFmRNA	
	用药组	对照组	用药组	对照组
1	8.5 ± 1.2 ^c	14.5 ± 2.9	11.6 ± 4.7 ^c	26.9 ± 5.0
2	17.4 ± 2.4 ^c	62.7 ± 7.5 ^a	15.5 ± 5.7 ^c	68.0 ± 8.3 ^a
4	26.0 ± 2.2 ^{a,c}	121.4 ± 12.7 ^a	40.1 ± 16.3 ^{a,c}	119.7 ± 9.3 ^a

^aP < 0.05 vs 前一时间组; ^cP < 0.05 vs 对照组。

表 2 NF-κB 和 MCP-1 的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

时间 t/wk	NF-κB		MCP-1	
	用药组	对照组	用药组	对照组
1	6.6 ± 1.4 ^c	17.6 ± 3.1	4.0 ± 1.6 ^c	10.8 ± 4.6
2	8.9 ± 1.6 ^c	39.1 ± 3.6 ^a	15.1 ± 3.9 ^{a,c}	46.9 ± 5.7 ^a
4	9.8 ± 1.1 ^c	101.0 ± 3.4 ^a	30.5 ± 6.0 ^{a,c}	120.4 ± 5.7 ^a

^aP < 0.05 vs 前一时间组; ^cP < 0.05 vs 对照组。

抗地高辛,37℃ 孵育 1h;滴加 SABC,37℃ 孵育 30min;生物素化过氧化物酶 37℃ 孵育 20min;AEC 室温显色,镜下控制反应时间;苏木素复染 20s,充分水洗,GVA 水溶性封片剂封片。呈团簇、点状的红色着色为阳性。用不含探针的杂交液进行杂交作为阴性对照,试剂盒中已知阳性切片作为阳性对照。应用 Image-Pro Plus 5.1 图像分析系统(美国 Media cybernetics 公司)对 NF-κB, MCP-1 和 FVIII-RAg 的阳性着色光密度、VEGFmRNA 阳性着色光密度进行半定量分析。每例标本 400 倍光镜下,选取连续切片中含有最大 CNV 直径的切片,对细胞因子的蛋白及基因表达阳性着色光密度进行 IOD 测量,取平均 IOD 值作为 1 例标本的观察值,每个观察时间点,均为 6 个实验动物。

统计学分析:所得数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学处理,分析组内差异的显著性用单因素方差分析,两两比较用 S-N-K 检验,同一时间内的组间比较用 Student *t* 检验。

2 结果

2.1 FVIII-RAg 和 VEGFmRNA 表达的变化 用药组 FVIII-RAg 蛋白表达随时间呈逐渐增加的趋势,早期为微量的点状的 FVIII-RAg 的蛋白表达,1wk 与 2wk 之间无统计学差异,在 4wk 时表达略增加,与 2wk 时相比具有统计学差异 ($P < 0.05$);同一时间内两组之间相比具有显著的统计学差异 ($P < 0.05$, 图 1),可见在对照组的 CNV 组织中的 FVIII-RAg 大量表达,并且随 CNV 生长其表达大大增加,逐渐围成管腔状(图 1A', B')。VEGFmRNA 的表达在用药组的 CNV 中较低,在 1,2wk 时有微弱的点状阳性着色,在 4wk 时增加,且与 2wk 相比有显著的统计学差异 ($P < 0.05$),但均显著地低于同时期对照组的 VEGFmRNA 的表达(图 2A, B, $P < 0.05$)。

2.2 NF-κB 和 MCP-1 表达的变化 用药组 NF-κB 的表达随时间呈逐渐增加的趋势,CNV 形成不明显(图 3),但在 4wk 时间内 NF-κB 的表达组内无明显差异;对照组中 NF-κB 的表达呈增加的趋势 ($P < 0.05$),同时期内两组之间相比具有显著的统计学差异 ($P < 0.05$, 图 3)。MCP-1 的免疫组化检查显示:在 4wk 时间内,用药组的 MCP-1 蛋白表达随 CNV 的生长而逐渐增强 ($P < 0.05$),但与同时期的对照组相比具有显著的统计学差异 ($P < 0.05$),用药组蛋白表达远远低于对照组(图 4)。

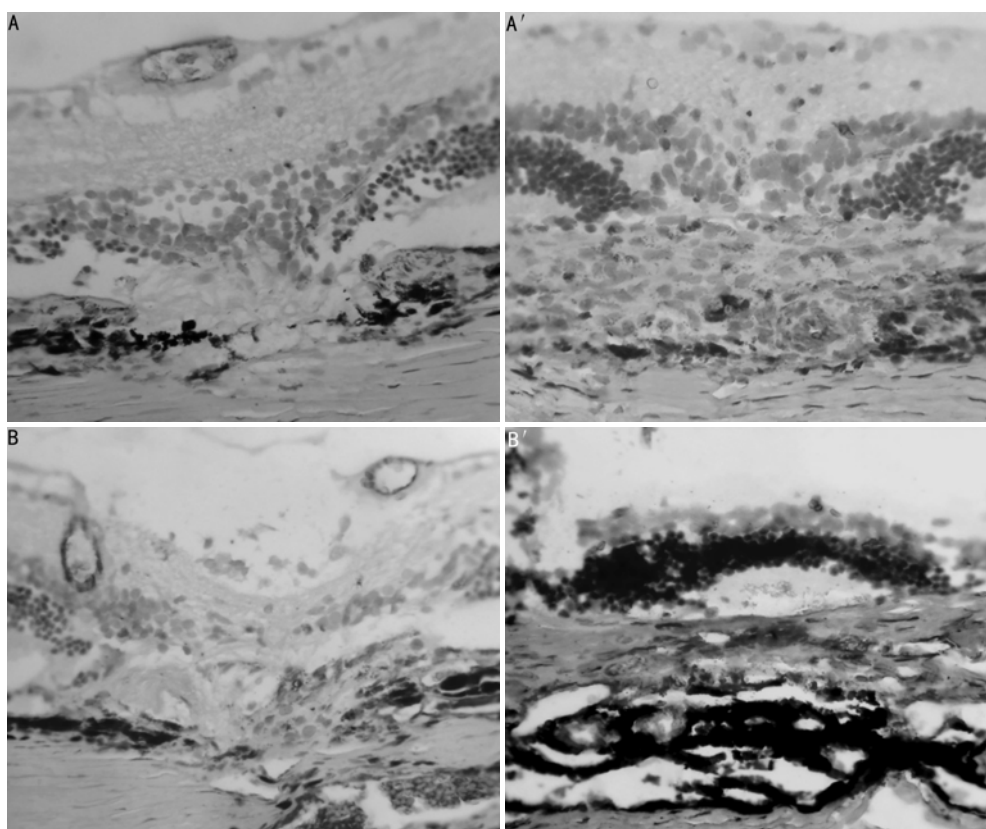


图1 光凝后 FVIII-RAg 表达 (HE ×400) A:光凝 1wk 后注射 TA 组 ;A':光凝 1wk 后注射 BSS 组;B:光凝 4wk 后注射 TA 组;B':光凝 4wk 后注射 BSS 组。

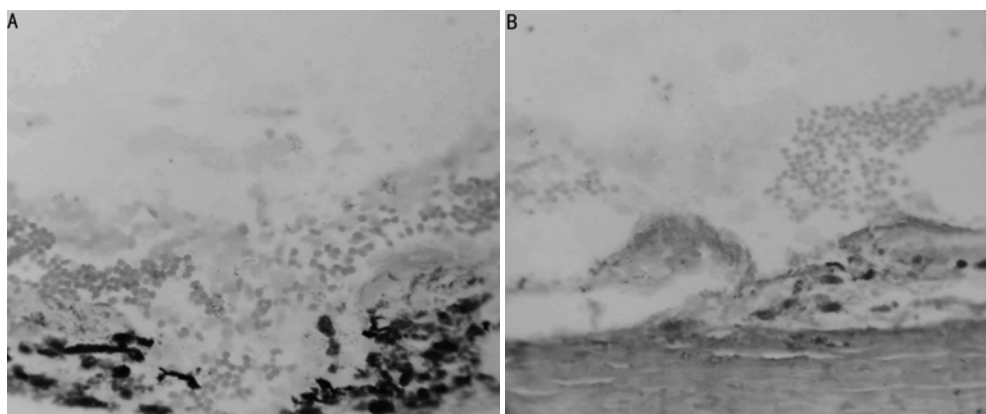


图2 实验光凝后 4wk VEGFmRNA 表达 (HE ×400) A:注射 TA 组;B:注射 BSS 组。

3 讨论

CNV 可导致不可逆性的中心视力损害,是许多脉络膜视网膜疾病的最终结局。治疗 CNV 的关键在于阻断其发展过程,药物治疗是最有希望阻断病变发展进程的方法,早期使用抗血管生成药物来控制 CNV 的发生、发展逐渐受到重视,如皮质类固醇^[1]就是其中之一。近期,人们开始关注采用 TA 玻璃体腔注射治疗眼内新生血管形成。已有学者通过各种临床或实验研究发现 TA 可抑制视网膜脉络膜新生血管形成^[1,3],但其机制还未知。FVIII-RAg 是已经公认的血管内皮细胞标记物。我们采用病理组织切片检测 FVIII-RAg 表达,观察 TA 对 CNV 的治疗作用。1, 2wk 时, FVIII-RAg 在用药组表达无明显差异, 4wk 略增加, 但均较同时期对照组明显降低, 证实了光凝后即刻玻璃体腔内注射 TA 8 μ L 显著地抑制新生血管形成和发展。Ciulla 等^[1]在 BN 大鼠 CNV 动物模型中, 激光光凝后即刻玻璃体腔内注射 TA 20 μ L 后, 在激光斑中未见到明显的

纤维血管膜形成,且在激光斑处巨噬细胞浸润减少,认为 TA 通过抑制白细胞和巨噬细胞释放血管形成因子而发挥抑制 CNV 的作用。最近,有临床资料证实玻璃体腔内注射 25mg 的 TA 可以抑制 ARMD 患者的新生血管^[4]。TA 治疗 CNV 的机制还未知,我们通过免疫组化及原位杂交的方法检查,可见在 CNV 生长的 4wk 时间内,在对照组中, MCP-1 表达随 CNV 的生长呈增加的趋势; NF- κ B 的表达也随 CNV 生长而增强; VEGF mRNA 的转录也逐渐增强。上述细胞因子可能通过多种不同的机制参与了 CNV 的生长发展,而 NF- κ B 作为转录调控细胞因子,通过上调其它细胞因子的表达,起始和促进了 CNV 的生长。其中, VEGF 是促进 CNV 形成的一个主要细胞因子, MCP-1 作为最有效的巨噬细胞趋化因子,促进了巨噬细胞浸润到脉络膜组织中而促使 CNV 形成。在本实验中,我们观察 TA 对于这些细胞因子转录和表达的影响。已知 MCP-1 基因和 VEGF 的基因^[5]的启动子区含有 NF- κ B 的结合位点或识

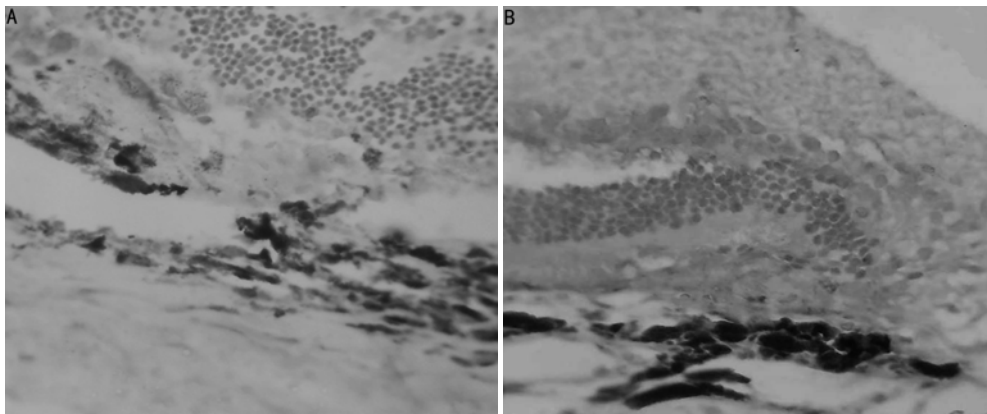


图3 实验光凝后4wk NF-κB表达(HE×400) A:注射TA组;B:注射BSS。

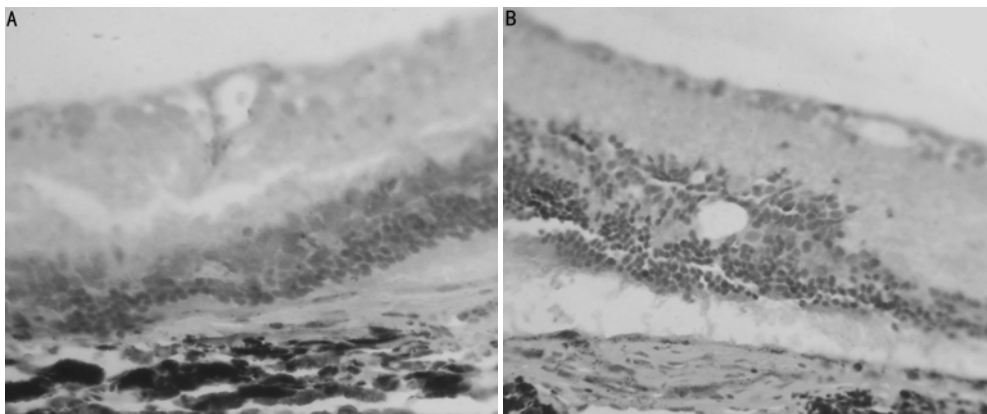


图4 实验光凝后4wk MCP-1表达(HE×400) A:注射TA组;B:注射BSS。

别位点,而糖皮质激素是 NF-κB 的药物抑制剂^[6]。本实验研究中,我们采用激光光凝后即刻在 BN 大鼠玻璃体腔内注射 TA,发现在激光斑处 CNV 组织中的 NF-κB 的表达较同时期对照组相比大大降低。有学者研究发现地塞米松可以选择性的抑制 NF-κBP65 亚单位,通过抑制 NF-κB 而发挥抗炎作用。这与本实验研究结果一致,TA 可以降低 BN 大鼠激光斑损伤区中的 NF-κB 活性,由此引起 MCP-1 表达及 VEGF mRNA 转录下调,抑制了激光斑损伤处的炎症反应,达到治疗效果。MCP-1 表达的降低还减少了巨噬细胞在 CNV 组织中的浸润,降低了 RPE 细胞的移行增殖,也抑制了 CNV 的形成和生长。Kato 等^[7]进行体外研究,在暴露于氧化应激环境中的 RPE 细胞中加入不同浓度的 TA,研究 TA 对 VEGF 及结缔组织生长因子表达的影响,发现可以降低 VEGF 和结缔组织生长因子的表达,并且与 TA 的浓度存在依赖关系。我们采用的是在激光光凝后即刻玻璃体内注射曲安奈德,光凝后 RPE 细胞及脉络膜血管内皮细胞等被激活,故 TA 可以对已经活化的细胞发挥有效的作用。本研究表明,光凝后即刻玻璃体腔内注射 TA 大大降低了 CNV 的形成,抑制 NF-κB 活化,下调靶基因 VEGF mRNA、降低 MCP-1 等表达,或直接地作用于活化的血管内皮细胞、巨噬细胞、RPE 细胞等抑制血管形成因子的分泌,从而抑制了 CNV 的形成发展。此外,有临床资料表明 TA 治疗 CNV 除抑制新生血管的生长,还能够改善视力,为这种疗法的可行性提供了科学根据。尽管 TA 玻璃体内注射在某些方面还存在一些争议,其生物学效应仍需进行更为深入的研究,目前国际上缺乏大样本、多中心、双盲、随机对照研究,而且有一些还处于

动物实验阶段,但是对于许多难治性的眼底疾病,如黄斑下 CNV,复发性 CNV,已显示出一定的优越性^[8]。我们发现,在 BN 大鼠 CNV 模型中激光光凝后即刻玻璃体腔内注射 TA,可抑制 NF-κB 及其靶基因 VEGF, MCP-1 的表达,抑制 CNV 生长,TA 是阻断 CNV 病程发展的理想药物。

参考文献

- 1 Ciulla TA, Criswell MH, Danis RP, *et al.* Intravitreal triamcinolone acetate inhibits choroidal neovascularization in laser-related rat model. *Arch Ophthalmol* 2001;119(3):399-404
- 2 赵世红,何守志. 氩激光诱导的大鼠脉络膜新生血管模型研究. *中华眼科杂志* 2003;39(5):298-302
- 3 Criswell MH, Hu WZ, Steffens TJ, *et al.* Comparing pegaptanib and triamcinolone efficacy in the rat choroidal neovascularization model. *Arch Ophthalmol* 2008;126(7):946-952
- 4 Jonas JB, Kreissig I, Hugger P, *et al.* Intravitreal triamcinolone acetate for exudative age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2003;87(4):462-468
- 5 Bancroft CC, Chen Z, Dong G, *et al.* Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways. *Clin Cancer Res* 2001;7(2):435-442
- 6 Almawi WY, Melemedjian OK. Negative regulation of nuclear factor- B activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 2002;28(2):69-78
- 7 Kato A, Kimura H, Okabe K, *et al.* Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by posterior sub-tenon administration of triamcinolone acetate. *Retina* 2005;25(4):503-509
- 8 Ranson NT, Danis RP, Ciulla TA, *et al.* Intravitreal triamcinolone in subfoveal recurrence of choroidal neovascularisation after laser treatment in macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2002;86(5):527-529