

⁹⁹Tc-MDP 对碱烧伤性大鼠角膜新生血管生成的抑制作用

孔 宁^{1,2}, 陆晓和¹, 李 斌²

作者单位:¹(510280)中国广东省广州市,南方医科大学附属珠江医院眼科;²(511400)中国广东省广州市番禺区中心医院
作者简介:孔宁,在职博士研究生,主治医师,研究方向:眼表疾病、眼底病。
通讯作者:陆晓和,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:眼表疾病。luxh63@163.com
收稿日期:2013-05-02 修回日期:2013-07-18

⁹⁹Tc-MDP inhibits corneal neovascularization induced by alkali burn in rats

Ning Kong^{1,2}, Xiao-He Lu¹, Bin Li²

¹Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China; ²Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xiao-He Lu. Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China. luxh63@163.com

Received:2013-05-02 Accepted:2013-07-18

Abstract

• AIM: To evaluate the effect of inhibition of ⁹⁹Tc-MDP on experimental corneal neovascularization in rats.

• METHODS: Chemical cauterization of the cornea was performed by touching alkali. Twenty-four healthy SD rats were divided randomly into two equal groups: experimental group underwent i. p. injection of ⁹⁹Tc-MDP everyday until 14th day after alkali burn. Control group underwent i. p. injection of normal saline as control. Rats were examined for detection of the first signs of neovascularization. 21 days later, lengths of neovascular and total corneal neovascularization area were assessed.

• RESULTS: The time of neovascularization in experimental group was 6.25±1.93 days, the control group was 5.83±1.86 days, and there was no statistically significant difference ($P=0.30$). The lengths of neovascular were 1.74±0.33mm and 2.82±0.25mm in two groups and the difference was statistically significant. The total neovascularization area was 17.3±3.26mm², 24.8±5.10mm² respectively and the difference between the two groups was statistically significant ($P<0.01$).

• CONCLUSION: ⁹⁹Tc-MDP has a significant effect on inhibition of alkali burn-induced corneal neovascularization.

• KEYWORDS: ⁹⁹Tc-MDP; corneal neovascularization; rat; inhibition

Citation: Kong N, Lu XH, Li B. ⁹⁹Tc-MDP inhibits corneal neovascularization induced by alkali burn in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(8):1547-1549

摘要

目的:探讨⁹⁹Tc-MDP对碱烧伤性大鼠角膜新生血管生成的抑制作用。

方法:采用碱烧伤法制备角膜新生血管模型,24只健康SD大鼠随机分成两组,实验组予以腹腔注射⁹⁹Tc-MDP,每天1次,至模型建立后14d。对照组以等体积的生理盐水腹腔注射。观察新生血管形成时间、第21d时角膜新生血管长度和新生血管面积。

结果:实验组新生血管长入的时间为6.25±1.93d,对照组长入时间为5.83±1.86d,差异无统计学意义($P=0.30$)。新生血管长度实验组为1.74±0.33mm,对照组为2.82±0.25mm;新生血管的面积实验组为17.3±3.26mm²,对照组为24.8±5.10mm²,两者之间差异均有统计学意义($P<0.01$)。

结论:使用⁹⁹Tc-MDP可以有效抑制碱烧伤引起的角膜新生血管的生成。

关键词:⁹⁹Tc-MDP(云克);角膜新生血管;大鼠;抑制

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.08.09

引用:孔宁,陆晓和,李斌.⁹⁹Tc-MDP对碱烧伤性大鼠角膜新生血管生成的抑制作用. *国际眼科杂志* 2013;13(8):1547-1549

0 引言

角膜新生血管的产生降低了角膜透明性,严重影响视力,而且是角膜移植术后发生角膜免疫排斥反应的高危因素,新生血管还常导致组织瘢痕化和持续性炎症,是临床上最常见、治疗最棘手的致盲性眼疾病之一^[1]。⁹⁹Tc-MDP是我国拥有自主知识产权的两个核素性药物之一,已经被证实临床上对于类风湿、强制性脊柱炎等炎症性疾病有明确作用,并广泛应用于临床。⁹⁹Tc-MDP是一种人工微量元素锝[⁹⁹Tc]与亚甲基二膦酸(MDP)的螯合物,是一种核素药物。其中⁹⁹Tc是放射性药物,但因其半衰期极长,其发射的β射线的能量极低,故对人体完全无害^[2]。其作用机制包括清除自由基、抑制白细胞介素-1表达、减少白细胞趋化、降低基质蛋白酶活性等。本研究应用此药物治疗碱烧伤引起的角膜新生血管,此前未见报道,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 健康的SD大鼠共24只,雌雄不限,体质量200g左右,全部购自中山大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 $^{99}\text{Tc-MDP}$ 的配制 $^{99}\text{Tc-MDP}$ 注射液由A剂和B剂组成,其中A剂每瓶5mL,内含高锝[^{99}Tc](0.05 μg)酸钠注射液;B剂为白色冻干粉,内含亚甲基二膦酸盐5mg,氯化亚锡0.5mg。为了确保药物的有效期,应在2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ (冰箱中)保存,使用前从低温处取出,再室温下放置20min左右,使其自然升温到室温(20 $^{\circ}\text{C}$ 左右),然后按无菌操作,将A剂注入B剂,充分振摇1min以上,使A剂与B剂充分反应螯合即生成锝[^{99}Tc]亚甲基二膦酸盐螯合物,再静置5min后即可使用^[2]。

1.2.2 动物模型的制作 SD大鼠用100g/L水合氯醛(3~3.5mL/kg)腹腔注射麻醉,1mol/L氢氧化钠溶液倒入培养皿中,将直径3mm的圆形滤纸片浸入其中达饱和,蘸去表面多余的液体。大鼠行爱尔凯因滴眼液表面麻醉,棉签拭干结膜囊后,镊子夹取滤纸片贴敷角膜中央,计时30s后迅速取下,生理盐水充分冲洗结膜囊,可见角膜中央圆形白色烧灼区,阿托品眼膏涂眼,模型制作完毕^[3]。

1.2.3 实验分组 24只大鼠随机平均分成两组,每组12只,均采用上述方法制作左眼碱烧伤模型。A组实验组腹腔注射 $^{99}\text{Tc-MDP}$,每天1次,至模型建立后14d;B组为对照组,以等体积的生理盐水腹腔注射。实验组的剂量均以高锝[^{99}Tc]为标准,即每盒药物为0.05 μg ,按照0.01 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 予以实验组腹腔注射。

1.2.4 观察指标 分别于造模后每天观察角膜新生血管情况,记录角膜新生血管发生时间,并于21d时测量最长的新生血管长度、新生血管面积并照相^[4]。新生血管的面积按照公式: $S=C/12\times 3.1416\times [r^2-(r-l)^2]$, C 为新生血管区的占整个角膜的圆周钟点数, $r=3\text{mm}$ (大鼠角膜半径), l 为新生血管长度(选择最长,走形最直的)^[1]。

统计学分析:采用SPSS 11.5软件,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,行两组独立样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

两组动物经碱烧伤后,均角膜水肿,中央上皮脱落,角膜缘血管网扩张,逐渐有新生血管长入。至第21d时,实验组角膜血管稀疏,未长入角膜中央烧灼区,部分角膜钟点未见新生血管。而对照组新生血管浓密迂曲,基本长入角膜中央,且360 $^{\circ}$ 角膜均有新生血管长入(图1)。实验组新生血管长入的时间为6.25 \pm 1.93d,对照组长入时间为5.83 \pm 1.86d,在延迟新生血管长入时间方面两组间差异没有统计学意义($P>0.05$),新生血管长度实验组为1.74 \pm 0.33mm,对照组为2.82 \pm 0.25mm,两者之间差异有统计学意义($P<0.05$)。新生血管的面积实验组为17.3 \pm 3.26mm²,对照组为24.8 \pm 5.10mm²,两者之间差异有统计学意义($P<0.05$,表1)。通过使用 $^{99}\text{Tc-MDP}$,可以明显抑制碱烧伤后角膜新生血管的长度和面积。

表1 实验组与对照组造模后第21d时角膜新生血管结果 $\bar{x}\pm s$

指标	实验组	对照组	P
新生血管面积(mm ²)	17.3 \pm 3.26	24.8 \pm 5.10	<0.01
最长新生血管长度(mm)	1.74 \pm 0.33	2.82 \pm 0.25	<0.01
最早出现新生血管时间(d)	6.25 \pm 1.93	5.83 \pm 1.86	0.30

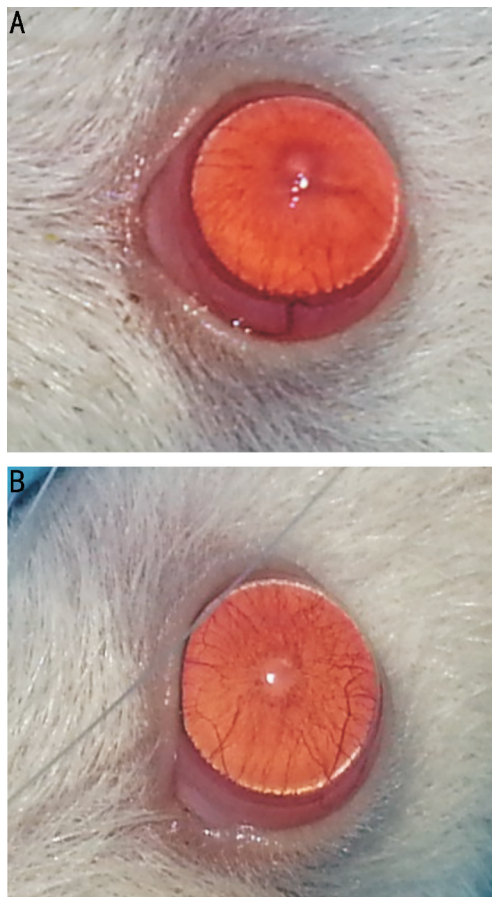


图1 实验组与对照组造模后21d时角膜新生血管照相 A:实验组;B:对照组。

3 讨论

各种原因引起的角膜新生血管,破坏了角膜的透明性,可以严重影响视力,甚至失明。目前对于外伤以及很多情况下,怎样去抑制新生血管是眼科医生的一个挑战。临床上近几年对角膜新生血管治疗的研究大量出现,包括肝素、环孢素A、非甾体抗炎药、贝伐单抗、激素、光动力治疗等。但目前这些治疗效果不是很理想,仍然需要更多的研究改进角膜新生血管的治疗。激素目前似乎是最好的治疗实验性角膜新生血管的药物,并且是临床上阻止角膜新生血管产生的主要药物,其作用机制主要是直接作用于新生血管的内皮细胞以及间接作用于可能刺激新生血管生长的附近组织的细胞^[5]。但同时激素的副作用比较大,可以阻止基质层的修复,甚至造成角膜穿孔。贝伐单抗是一种VEGF(血管内皮生长因子)的单克隆抗体,被用于临床上治疗脉络膜新生血管的新药,已有大量的研究可以证实抗VEGF药物可以治疗角膜新生血管,但是有研究表明能减少角膜神经修复不利于伤口的愈合,而且治疗费用昂贵^[3,6-8]。目前使用光动力治疗能

有效地抑制角膜新生血管,但是长效作用没有得到证实,并且反复治疗,此治疗方法成本昂贵,限制了在临床上的应用^[9]。

我们的目的是寻找一种简单有效的治疗角膜新生血管的药物。⁹⁹Tc-MDP 已经被证实临床上对于许多炎症性疾病如类风湿关节炎等疗效明确^[10],并有报道用于甲亢伴浸润性突眼和兔实验性葡萄膜炎^[11-14],取得了较好的效果。Lai 等^[2]首次使用云克治疗脉络膜新生血管,发现⁹⁹Tc-MDP 可以在不同的浓度抑制脉络膜新生血管的产生。他们的结论中,⁹⁹Tc-MDP 可以有效抑制脉络膜新生血管形成过程的 VEGF 和 MMPs(基质金属蛋白酶)的表达,并通过这种机制抑制新生血管的表达。而大量研究表明,VEGF 和 MMPs 也参与到了角膜新生血管形成当中,从理论上来说,⁹⁹Tc-MDP 有抑制角膜新生血管发生的可能,所以尝试去验证我们的设想。

我们选择碱烧伤角膜新生血管模型去证实该药物的作用,从我们的结果中可以看出,使用⁹⁹Tc-MDP 后可以有效地抑制角膜新生血管的长入,两组间新生血管面积的差异有统计学意义。实验组新生血管的面积、长度均小于对照组,使用药物后,碱烧伤引起的新生血管面积减少了 30% 以上。我们认为,⁹⁹Tc-MDP 抑制角膜新生血管主要是与他的抗炎等作用机制有关。⁹⁹Tc-MDP 作用机制包括清除自由基、抑制 IL-1(白细胞介素-1)表达、减少白细胞趋化、降低基质蛋白酶活性,并且可以抑制 VEGF/MMPs 的表达^[2,9]。从我们的结果可以看出,⁹⁹Tc-MDP 治疗角膜新生血管是有效的,并可能通过对角膜 MMPs 和 VEGF 的影响从而抑制碱烧伤引起的角膜新生血管的产生。我们的结果中,在延迟新生血管生成方面,⁹⁹Tc-MDP 没有明显的作用。这可能是多个方面的原因引起的,如腹腔注射导致药物有效浓度不足、角膜新生血管产生机制复杂^[15]等,这也是我们需要进一步研究明确的目标。

我们的研究仅仅从碱烧伤引起角膜新生血管的角度去观察⁹⁹Tc-MDP 的作用,有一定的局限性。仍然需要对其相关作用机制和药物对角膜安全性行进一步研究。

参考文献

1 黎燕英,雷鹏,陆守权,等.雷公藤多甙抑制化学烧伤性角膜新生

血管的实验研究.国际眼科杂志 2012;12(8):1467-1469

2 Lai K, Xu L, Jin C, et al. Technetium-99 conjugated with methylene diphosphonate (⁹⁹Tc - MDP) inhibits experimental choroidal neovascularization *in vivo* and VEGF-induced cell migration and tube formation *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(8):5702-5712

3 钟丽欣,成霄黎.贝伐单抗抑制碱烧伤角膜新生血管的实验研究.山西医科大学学报 2009; 40(4):326-328

4 Hosseini H, Nejabat M, Mehryar M, et al. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007; 35:745-748

5 Hoffart L, Matonti F, Conrath J, et al. Inhibition of corneal neovascularization after alkali burn: comparison of different doses of bevacizumab in monotherapy or associated with dexamethasone. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010; 38:346-352

6 Ellenberga D, Azar DT, Hallak JA, et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Prog Retin Eye Res* 2010; 29:208-248

7 Yu CQ, Zhang M, Matis KI, et al. Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(9):3870-3878

8 朱丹,陆晓和,付月,等. PEDF 和 Avastin 对大鼠角膜碱烧伤新生血管作用的比较.国际眼科杂志 2013;13(2):235-239

9 Holzer MP, Solomon KD, Vroman DT, et al. Photodynamic Therapy with Verteporfin in a Rabbit Model of Corneal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2954-2958

10 穆荣,陈适,栗占国,等. ^{99m}Tc-亚甲基二膦酸盐在类风湿关节炎的疗效及其对炎症细胞因子的抑制作用.中华风湿病学杂志 2004; 27(1):39-41

11 桑士标,李清茹,吴翼伟,等.云克治疗甲亢伴浸润性突眼的疗效分析.苏州大学学报(医学版) 2005;25(6):1106-1107

12 田蓉,匡安仁,秦卫仕,等.⁹⁹Tc-MDP 与免疫抑制治疗 Graves' 眼病的对比研究.中华核医学杂志 2000;20(6):250-253

13 韦智晓,李俊红,覃伟武,等.云克配合¹³¹I 治疗 Graves 病合并 Graves 眼病的近期疗效.中国医学影像技术 2008;24(10):1644-1646

14 张开颜,洗文光,金陈进,等.⁹⁹Tc-MDP 对兔实验性葡萄膜炎的治疗作用.眼科研究 2009;27(8):668-671

15 Cursiefen C, Rummelt C, Kuchle M. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor alpha, and transforming growth factor beta1 in human corneas with neovascularization. *Cornea* 2000;19(4):526-533