

环氧化酶-2 抑制剂抑制大鼠角膜新生血管的研究

赵慧英 孙旭光 王智群 李 然

The effects of COX-2 inhibitor on corneal angiogenesis in rat

Zhao Huiying, Sun Xuguang, Wang Zhiquan, Li Ran. Department of Ocular Microbiology, Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Hospital, Capital University of Medical Science, Beijing 100005, China

Abstract Objective Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor is a new nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and its action is to suppress the inflammatory reaction. Present study was to investigate the inhibitory effect of COX-2 inhibitor, meloxicam, on corneal neovascularization (CNV). **Methods** Corneal new blood vessel was induced in the right eyes of 50 Wistar rats by scratching in cornea with 3 mm corneal trephine, and then the interrupted suturing was performed at the positions of 3:00, 7:00 and 11:00 with 10-0 nylon stitches. 0.05 mL of 0.625, 1.25, 5.0 mg/mL meloxicam solution was injected subconjunctivally in the model eyes from the end of the operation through 7 days once each day in the 1st, 2nd, 3rd group respectively. The same volume of dexamethasone (2 mg/mL) or solvent was used in the group 4 or group 5. Corneal angiogenesis was clinically evaluated and quantitatively analysed at 5, 8, 12, 16 and 23 days after operation under the slit lamp. Expression of Ang-2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in the cornea was detected using RT-PCR. **Results** The new blood bud appeared in the 4th day after operation. The area of new blood vessels was gradually increased and reached peak in the 8th day. The mean area of CNV in group 2, 4 was significantly smaller than that of other groups in the 5th and 8th day ($P < 0.01$). On day 5, the mean area of CNV in group 4 was smaller than that of group 2 ($P < 0.05$). On day 8 and 23, the expression of Ang-2 mRNA and VEGF mRNA in group 5 was significantly enhanced in comparison with other groups, and expression of VEGF mRNA followed the same pattern to Ang-2 mRNA. **Conclusion** Topically administration of meloxicam can inhibit CNV effectively through descending the transcription of Ang-2 and VEGF.

Key words COX-2 inhibitor; meloxicam; cornea neovascularization; vascular endothelial growth factor

摘要 目的 探讨环氧化酶-2 (COX-2) 抑制剂美洛昔康对角膜新生血管 (CNV) 的抑制作用及其作用机制。 **方法** 缝线法诱导大鼠 CNV 形成; 将动物分 5 组; 第 1~3 组分别为 0.625、1.25、5.0 mg/mL 美洛昔康组, 第 4 组为地塞米松组, 第 5 组为阴性对照组。裂隙灯照相并计算 CNV 面积, RT-PCR 法观察角膜 VEGF 和 Ang-2 mRNA 表达。 **结果** 第 5 组 CNV 面积明显高于其他各组 ($P < 0.05$)。第 5 天、第 8 天时, 第 2 组、4 组 CNV 面积明显低于其余各组 ($P < 0.01$); 第 5 天时, 第 4 组 CNV 面积明显低于第 2 组 ($P < 0.05$)。缝线后第 8 天、第 23 天, 第 2~4 组 Ang-2 mRNA、VEGF mRNA 表达均低于第 5 组。 **结论** COX-2 抑制剂美洛昔康可明显抑制 CNV 的增生, 可能通过减少 VEGF、Ang-2 的转录实现。

关键词 环氧化酶-2 抑制剂; 美洛昔康; 角膜新生血管; 血管内皮生长因子

分类号 R 772.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)08-0680-04

角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 的形成涉及多种病理机制, 其中炎症反应在 CNV 发生中起重要的作用^[1]。非甾体类抗炎药物、糖皮质激素和 IL-1 受体拮抗剂均可通过其抑制炎症环节, 达到抑制 CNV 形成的作用^[2]。环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)

抑制剂是一类新型的非甾体类药物, 可选择性较高地抑制 COX-2 的活性, 同时降低不良反应。本实验在缝线法诱导的大鼠炎症性 CNV 模型的基础上, 从控制炎症环节入手, 观察 COX-2 抑制剂美洛昔康对 CNV 的抑制作用, 并对其抑制机制进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性 Wistar 大鼠 50 只, 体重 200

作者单位: 100005 北京, 首都医科大学附属北京同仁医院眼科中心
北京市眼科研究所 (赵慧英, 研究生, 现在解放军总医院第二附属医院眼科, 北京 100091)

通讯作者: 孙旭光 (Email: sunxuguang@yahoo.com)

~220 g, SPF 级, 购自北京市维通利华技术有限公司。观察 3 d, 动物健康无眼病。

1.1.2 实验用药 美洛昔康注射液 (5.0 mg/mL) 及其溶剂 (中国医药研究开发中心胡昌教授惠赠)。美洛昔康化学名称为 4-羟基-2-甲基-N-(5-甲基-2-噻唑基)-2-氢-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物, 分子式为 $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$, 相对分子质量为 351.40 (图 1)。本实验所用的美洛昔康注射液 pH 值约为 8。

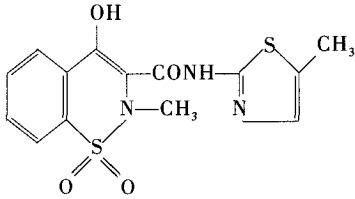


图 1 美洛昔康化学结构图
Fig. 1 Chemical structure of Meoxicam

1.1.3 RT-PCR 试剂 Trizol、PCR Mastermix (2x) (北京天为时代公司); cDNA synthesis Kit (美国 Neomarker 公司); 引物序列 (北京赛百盛公司合成): 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF): 序列: 5'-CGACAGAAGGGGAGCAGAAAG-3', 反向序列: 5'-GCAAGTACGTTTCGTTTAACTC-3' (目的片断 464 bp 和 536 bp); 血管生成素-2 (angiopoietin-2, Ang-2): 序列: 5'-GAGATCAAGGCCTACAGTGA-3', 反向序列: 5'-AAGTTGGAAGGACCACATGC-3' (目的片断 443 bp); β -actin (内参照): 序列: 5'-TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3', 反向序列: 5'-AGTACTGCGCTCAGGAGGA-3' (目的片断 313 bp)。

1.2 方法

1.2.1 CNV 动物模型的建立 所有动物均采用右眼造模。术前剪去大鼠睫毛, 地西洋注射液和盐酸氯胺酮注射液各 0.1 mL/100 g 肌内注射全身麻醉, 点 1% 复方托吡卡胺滴眼液散瞳, 点 0.4% 倍诺喜滴眼液表面麻醉, 眼周 75% 乙醇消毒, 铺孔巾, 用直径为 3 mm 的环钻于角膜中央做划痕, 分别于 3:00、7:00、11:00 位用 10-0 线角膜深基质层间断缝合, 跨度约 0.5 mm, 角膜表面留置线头长约 0.5 mm; 术毕涂红霉素眼膏。

1.2.2 动物分组及给药方法 将大鼠编号后, 用随机数字表法随机分为 5 组。第 1、2、3 组, 分别给予 0.625、1.25、5.0 mg/mL 美洛昔康注射液 0.05 mL 球结膜下注射, 自造模当日起, 每日 1 次, 共 7 d; 第 4 组为阳性对照组, 给予地塞米松 2 mg/mL 0.05 mL 球结膜下注射, 每周 2 次, 共 2 周; 第 5 组为阴性对照组, 自造模当日起给予美洛昔康溶剂 (不含美洛昔康) 0.05 mL 球结膜下注射, 每日 1

次, 共 7 d。除第 2 组动物为 18 只外, 其余各组均为 8 只。

1.2.3 CNV 的定量分析 大鼠角膜缝线后第 5、8、12、16、23 天, 每只动物均进行裂隙灯显微镜观察照相, 并记录。CNV 面积 (S) 据 Robert 电脑教学模式 $S = C/12 \times 3.14 \times [r^2 - (r-L)^2]$ 计算, 其中 C 为新生血管累及角膜钟点数, r 为角膜半径 (为消除不同角膜半径所致的计算面积差异, 角膜半径按统一数值 2.5 mm, 新生血管长度作统一换算), L 为新生血管的长度, 新生血管长度测量以连续弯曲度小、新生血管朝向角膜中央生长的最长的血管为准^[3]。

1.2.4 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 和 Ang-2 mRNA 的表达 分别于缝线后第 8 天、23 天各处死 4 只大鼠, 用显微剪剪取角膜组织, 剪碎, 匀浆, 离心, 取上清。Trizol 提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 以此为模板进行 PCR 反应。VEGF 退火温度为 65 °C, Ang-2 退火温度为 65 °C, β -actin 退火温度为 60 °C; 均循环 35 次。产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/L 的 EB) 上电泳, 凝胶成像系统照相, BandScan 软件扫描各目的条带的灰度值, 并将 VEGF 和 Ang-2 条带与相同标本的 β -actin 灰度值相比, 即为 Ang-2 和 VEGF 相对于 β -actin mRNA 的表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件对数据进行分析。实验中各测试指标的数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。术后 5 个组的 CNV 面积比较、5 个组模型眼第 8 天和第 23 天时 Ang-2 mRNA 及 VEGF mRNA 相对表达量的总体比较采用单因素方差分析, 组间的两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 美洛昔康对大鼠 CNV 的抑制作用

缝线后大鼠 CNV 经历了出芽、生长、高峰及消退的变化。缝线后第 1 天, 大鼠结膜血管充血, 角膜缘血管网轻度扩张; 第 4 天出现角膜新生血管芽; 之后新生血管向中央区角膜生长, 面积不断增加; 第 8 天各组新生血管面积、新生血管密度及管径达到最高值; 之后渐降低, 管径也变细。与相同时间点的阴性对照组相比, 其余 4 组 CNV 长度短、密度稀疏、累及范围小, 以第 2 组、第 4 组更为明显 (图 2)。

统计学结果表明, 在各时间点, 第 5 组 CNV 的面积明显大于其余各组 ($P < 0.05$)。第 5 天、8 天时, 第 2 组、4 组 CNV 面积明显小于其余各组 ($P < 0.01$); 第 5 天时, 第 4 组 CNV 面积明显小于第 2 组 ($P < 0.05$)。第 12、16、23 天时, 第 1~4 组各时间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

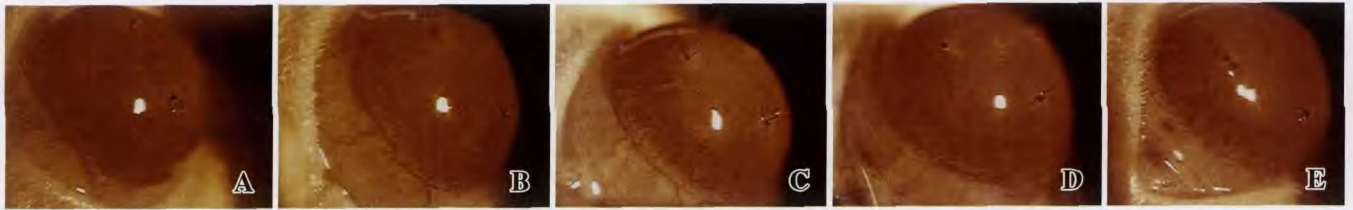


图2 第8天大鼠 CNV 的面积 A:第1组 B:第2组 C:第3组 D:第4组 E:第5组
Fig.2 The area of corneal neovascularization at the 8th day after operation A:group 1 B:group 2 C:group 3 D:group 4 E:group 5

表1 术后各时间点各组的 CNV 面积比较 ($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)
Table 1 Comparison of corneal neovascularization area among different groups ($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)

| Group | n | Area of corneal neovascularization at different time after operation | | | | |
|-----------------------|---|--|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 5 d | 8 d | 12 d | 16 d | 23 d |
| 0.625 mg/mL meloxican | 4 | 2.51 ± 0.11 ^{bef} | 13.80 ± 1.93 ^{bef} | 4.50 ± 0.00 ^b | 3.72 ± 0.61 ^b | 3.72 ± 0.90 ^b |
| 1.25 mg/mL meloxican | 4 | 1.82 ± 0.03 ^b | 2.51 ± 0.02 ^b | 3.71 ± 0.86 ^b | 4.53 ± 0.00 ^b | 4.52 ± 0.00 ^b |
| 5.0 mg/mL meloxican | 4 | 3.30 ± 0.14 ^{bef} | 8.34 ± 3.95 ^{bef} | 4.31 ± 0.40 ^b | 3.91 ± 0.71 ^b | 4.51 ± 0.00 ^b |
| Dexamethasone | 4 | 0.31 ± 0.05 ^{bc} | 2.93 ± 0.11 ^b | 13.84 ± 2.80 | 4.01 ± 0.70 ^b | 4.51 ± 0.00 ^b |
| Solvent | 4 | 14.20 ± 1.18 | 17.90 ± 0.00 | 17.00 ± 2.63 | 17.62 ± 2.94 | 17.60 ± 2.94 |
| F | | 15.485 | 4.186 | 4.617 | 6.238 | 3.416 |
| P | | 0.000 | 0.018 | 0.015 | 0.005 | 0.041 |

^b*P* < 0.05 vs respective solvent group, ^c*P* < 0.01 vs respective 1.25 mg/mL meloxican group, ^f*P* < 0.01 vs respective dexamethasone group (One-way ANOVA, SNK-*q* test)

2.2 RT-PCR 结果 各组第8天和第23天时 Ang-2 mRNA 及 VEGF mRNA 在角膜的相对表达量差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。第8天时,第2组、4组与第3组、5组比较差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);第23天时,第2组、4组与第1、3、5组比较差异均有统计学意义 (*P* < 0.05);其他组间比较差异均无统计学意义 (*P* > 0.05) (表2)。缝线后 CNV 面积峰值时及缝线后 CNV 消退时大鼠角膜组织 Ang-2 mRNA、VEGF mRNA 表达情况见图3,4。

表2 模型眼第8天和23天时 Ang-2 mRNA 及 VEGF mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression of Ang-2 and VEGF mRNA on day 8 and 23 after operation ($\bar{x} \pm s$)

| Group | n | 8 days | | 23 days | |
|-----------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Ang-2 mRNA | VEGF mRNA | Ang-2 mRNA | VEGF mRNA |
| 0.625 mg/mL meloxican | 4 | — | — | 0.100 ± 0.018 | 0.370 ± 0.038 |
| 1.25 mg/mL meloxican | 4 | 0.008 ± 0.000 | 0.054 ± 0.001 | 0.020 ± 0.005 | 0.137 ± 0.031 |
| 5.0 mg/mL meloxican | 4 | 0.298 ± 0.010 ^{be} | 0.190 ± 0.016 ^{be} | 0.107 ± 0.010 ^{beh} | 0.210 ± 0.060 ^{beh} |
| Dexamethasone | 4 | 0.174 ± 0.024 | 0.058 ± 0.001 | 0.034 ± 0.006 | 0.142 ± 0.040 |
| Solvent | 4 | 0.391 ± 0.081 ^{be} | 0.360 ± 0.092 ^{be} | 0.310 ± 0.027 ^{beh} | 0.438 ± 0.028 ^{beh} |
| F | | 13.385 | 16.855 | 10.459 | 7.484 |
| P | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 |

^b*P* < 0.05 vs respective 5.0 mg/mL meloxican group, ^e*P* < 0.05 vs respective solvent group, ^h*P* < 0.05 vs respective 0.625 mg/mL meloxican group

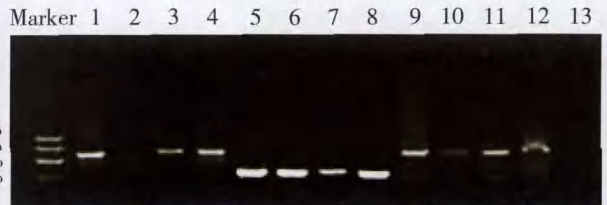


图3 第8天时各组角膜 Ang-2、β-actin 和 VEGF RT-PCR 凝胶电泳结果 Marker:分子标记 1~4;第2~5组 Ang-2 的表达 5~8;第2~5组 β-actin 的表达 9~12;第2~5组 VEGF 的表达 13;PCR 反应阴性对照体系

Fig.3 Electrophoresis of RT-PCR product of Ang-2, β-actin and VEGF of corneas in each group on day 8 Marker: molecular marker 1-4; expression of Ang-2 from group 2 through 5 5-8; expression of β-actin from group 2 through 5 9-12; expression of VEGF from group 2 through 5 13; negative control of PCR reaction system

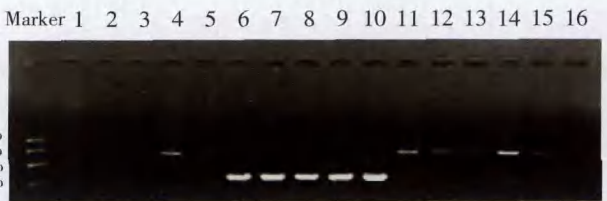


图4 第23天时各组角膜 Ang-2、β-actin 和 VEGF RT-PCR 凝胶电泳结果 Marker:分子标记 1~5;第1~5组 Ang-2 的表达 6~10;第1~5组 β-actin 的表达 11~15;第1~5组 VEGF 的表达 16;PCR 反应阴性对照体系

Fig.4 Electrophoresis of RT-PCR product of Ang-2, β-actin and VEGF of corneas in each group on day 23 Marker: molecular marker 1-5; expression of Ang-2 from group 1 through 5 6-10; expression of β-actin from group 1 through 5 11-15; expression of VEGF from group 1 through 5 16; negative control of PCR reaction system

3 讨论

3.1 COX-2 抑制剂美洛昔康对 CNV 的抑制作用

炎症反应在 CNV 发生中起重要的作用。Oh 等^[1]认为没有炎症就没有 CNV 形成,且 CNV 生成的速度与炎症反应的程度在某种程度上成正比。前列腺素 (prostaglandin, PGs) 是重要的炎性介质之一,许多实验证实,糖皮质激素、非甾体类抗炎药物、IL-1 受体拮抗剂均可通过抑制 PGs 合成而抑制 CNV 形成。

COX 是催化 PGs 合成的限速酶。COX 有 2 种异构体,结构型酶 COX-1 和诱导型酶 COX-2。在炎症反

应及炎症因子的刺激下,COX-2 表达升高,催化病理性 PGs 合成,参与炎症反应。非甾体类抗炎药物大多同时抑制 COX-1 和 COX-2 的活性,但其抗炎作用主要通过抑制 COX-2 活性实现。COX-2 抑制剂是一类新型的非甾体类药物,可选择性较高地抑制 COX-2 的活性,提高疗效,降低不良反应。

实验证实,全身给予 COX-2 抑制剂可有效抑制 CNV^[4]。本研究证实各质量浓度美洛昔康球结膜下注射均可有效抑制缝线后大鼠 CNV 的形成,表现为较阴性对照组新生血管长度短、覆盖范围小、密度低。值得注意的是,第 5 天、8 天时,高质量浓度(5.0 mg/mL)美洛昔康抑制 CNV 的作用明显低于中质量浓度(1.25 mg/mL)组。推测 5.0 mg/mL 美洛昔康在角膜达到很高的质量浓度,激发角膜炎症反应加重并产生“COX-2 样酶”^[5],从而在抑制 CNV 形成的同时促进 CNV 形成。

3.2 COX-2 抑制剂美洛昔康对 CNV 抑制作用的作用机制

VEGF 被认为是眼部最重要的新生血管刺激因子^[6]。血管生成素家族 Ang 是继 VEGF 之后一类特异性作用于血管内皮细胞的促血管形成的因子,血管生成素家族有 4 个成员,分别为 Ang-1、Ang-2、Ang-3 及 Ang-4。Ang-2 在成年机体呈诱导性表达,与局部新生血管的形成关系密切。随着对 Ang-2 在新生血管形成过程中重要始动作用的深入认识,Ang-2 在 CNV 形成过程中的作用也逐渐被认识。

目前,COX-2 抑制剂对 CNV 抑制作用的机制尚不完全清楚。研究表明,COX-2 抑制剂抑制肿瘤组织中新生血管形成的作用可部分地通过下调促新生血管形成因子的表达而实现^[6-7],COX-2 抑制剂对鼠视网膜

COX-2 及 VEGF 表达均有明显的抑制作用^[7-8]。本研究表明,阴性对照组 Ang-2 和 VEGF mRNA 的表达量均明显高于其余各组,提示美洛昔康可能通过降低重要的促 CNV 形成的因子 Ang-2 和 VEGF 的转录水平而抑制 CNV 的形成。

激素可有效地抑制 CNV,但长期应用可继发青光眼、白内障、感染等不良反应。非甾体类抗炎药的不良反应主要为局部刺激感、眼发红、结膜充血等;目前未见 COX-2 抑制剂眼部不良反应的报道。

参考文献

- Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al. The anti-inflammatory effect of subconjunctival bevacizumab on chemically burned rat corneas[J]. *Curr Eye Res*, 2009, 34(2): 85 - 91
- Castro MR, Lutz D, Edelman JL. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 79(2): 275 - 278
- Seo K, Choi J, Park M, et al. Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas[J]. *J Vet Sci*, 2001, 2(2): 125 - 130
- Leathy KM, Ornberg RL, Wang Y, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 625 - 631
- Simmons DL, Botting RM, Robertson M, et al. Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid anti-inflammatory drugs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3275 - 3280
- 胡文静,周善璧. 血管内皮生长因子及其受体通道与角膜新生血管的关系研究进展[J]. *眼科研究*, 2008, 26: 949 - 951
- Masferrer JL, Leathy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 1306 - 1311
- Ayalasomayajula SP, Kompella UB. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits retinal vascular endothelial growth factor expression and vascular leakage in a streptozotocin-induced diabetic rat model[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 458: 283 - 289

(收稿:2008-09-15 修回:2009-05-28)

(本文编辑:王莉红)

· 病例报告 ·

Leber 先天性黑矇长期误诊为弱视一例

余新平 许梅萍

Leber 先天性黑矇为一种重要的致盲性先天性视网膜疾病,全球新生儿发病率约为 2 ~ 3/100 000,占遗传性视网膜疾病的 5% 以上,在全球范围内为盲校儿童盲原因的 20%^[1]。该病具有特殊的眼部表现,视功能预后不良,漏诊或误诊后易当作一般的弱视进行治疗,增加患儿痛苦和家庭压力。目前国内文献报道较少^[2-3],我们近期诊治 1 例,现报告如下。

患儿,女,6 岁,因发现双眼视物不清、眼球不能固视 5 年余于 2007 年 3 月于我院就诊。患儿出生后不久即出现眼球不能固视,双眼左右摆动,在患儿生长过程中发现其视物不清,尤其夜视力更差。追问病史,患儿平时视物时喜揉搓双眼。眼部检查:视力右眼 0.04,左眼 0.04,双眼无明显偏斜,眼球钟摆样震颤,双眼角膜、晶状体透明,瞳孔 5 mm × 5 mm,对光反应迟钝,眼底检查视盘边界清、淡红,视网膜血管走行正常,黄斑区中心凹反光弥散,未见明显色素改变;周边视网膜略呈青灰色,未见明显色素改变和骨细胞样堆积。全身无明显异常。1% 阿托品