

苦参碱聚乳酸微球防治增生性玻璃体视网膜病变的研究

刘丹岩 马景学 安建斌 王 萌

Preventive effect of matrine polyactic acid microsphere on proliferative vitreoretinopathy

Liu Danyan, Ma Jingxue, An Jianbin, Wang Meng. Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Abstract Objective To establish a matrine delivery system in vitreous is very important for the dynamic treatment of proliferative vitreoretinopathy (PVR). Present study was to evaluate the efficacy of matrine polyactic acid microsphere (MAT-PLA-MS) in prevention of PVR. **Methods** The suspension of cultured fibroblasts was injected into vitreous cavity of 30 healthy adult New Zealand albino rabbits to induce PVR. Then the experimental rabbits were divided into 3 groups and 10 rabbits for each. The animals received intravitreal injection of 0.3 mL MAT-PLA-MS (4 mg) matrine in MAT-PLA-MS group. Free matrine normal sodium solution 0.3 mL (containing 2mg matrine) was injected in vitreous cavity in free matrine group. 0.3 mL normal saline solution was injected into the vitreous of the left eyes and the equivalent volume of blank polyactic acid microsphere (blank-PLA-MS) into the right eyes in control group. The changes of cornea, aqueous humor, lens, vitreous and fundus were examined and recorded by slit lamp biomicroscope, indirect ophthalmoscope, fundus color camera and B ultrasonogram on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 21st, 28th and 35th day following injection of drug. The inhibition effect of matrine on PVR was evaluated according to Ryan's grading criteria of PVR. **Results** On the 14th days after implantation of MAT-PLA-MS, the rate of retinal detachment was 60%, 10%, 5% and 60% in normal saline group, free matrine group, MAT-PLA-MS group and blank-PLA-MS group respectively. Statistically significant difference was found among normal saline group, blank-PLA-MS group, MAT-PLA-MS group and free matrine group ($P < 0.05$). On the 21st day after injection of fibroblasts, the morbidity of retinal detachment was 80%, 30%, 10% and 80% in normal saline group, free matrine group, MAT-PLA-MS group and blank-PLA-MS group respectively, showing a significant difference among different groups. On the 28th day, the incidence rate of retinal detachment was 90%, 50%, 15% and 90% respectively, presenting statistical difference among various groups ($P < 0.05$) as well as between free matrine group and MAT-PLA-MS group ($P < 0.05$). On the 35th day, considerably difference also was seen in the morbidity of retinal detachment among various groups (90%, 60%, 15% and 90% respectively) ($P < 0.05$). **Conclusion** Implantation of MAT-PLA-MS into vitreous cavity can effectively inhibit the development of PVR induced by fibroblasts in rabbit model.

Key words matrine; polyactic acid; microsphere; proliferative vitreoretinopathy

摘要 目的 评价苦参碱聚乳酸微球防治实验性增生性玻璃体视网膜病变(PVR)的效果。**方法** 30只新西兰白兔玻璃体腔注入成纤维细胞悬液制备PVR模型。随机分为3组,玻璃体腔分别注入载药微球(含苦参碱4mg)、游离苦参碱(2mg)、生理盐水和空白聚乳酸微球。玻璃体腔手术操作后第1、3、7、14、21、28、35天观察眼前节炎症反应情况、玻璃体混浊程度、玻璃体腔内微球分解过程、玻璃体内增生情况及视网膜是否脱离以及脱离的程度。**结果** 所有动物1周内前房有轻~中度的炎症反应,1周后消失。各组均有不同比例的动物在不同时间点发展为PVR I~III级。视网膜脱离的发生率:游离药物组与对照组比较,除35d外,其余各时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$);载药微球组与对照

本课题为河北省自然科学基金资助(303638)

作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院眼科

通讯作者:马景学 (Email: majingxue2003@yahoo.com.cn)

组相比,各时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$);载药微球组与游离药物组比较,28 d 和 35 d 时差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 苦参碱聚乳酸微球兔眼玻璃体腔注射能够有效防治实验性 PVR。

关键词 苦参碱;聚乳酸;微球;增生性玻璃体视网膜病变

分类号 R 776 R774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)11-0950-05

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是外伤性、血管性、炎症性视网膜病变或裂孔源性视网膜脱离长期未复位或视网膜复位术后,细胞性膜在玻璃体腔及视网膜内外表面形成和收缩所致的一类病变,是严重影响视力的眼科疾病之一,也是视网膜脱离复位手术失败的主要原因,手术效果不理想,因此探求安全有效的药物治疗是防治 PVR 的必要措施^[1-2]。目前临床上尚无安全有效的 PVR 防治药物^[3]。苦参碱作为一种分离提取的中药单体成分,具有突出的抗增生、抗纤维化作用^[4],我们的系列研究已证实了其体外抑制成纤维细胞增生的作用,但 PVR 的发生发展是一个缓慢的动态过程,游离药物无法在玻璃体内长时间维持有效的药物浓度,为此我们制备了药物的缓释系统—苦参碱聚乳酸微球 (matrine polyactic acid microsphere, MAT-PLA-MS),并对其在眼内的药代动力学进行了研究^[5]。本研究评价苦参碱聚乳酸微球抑制实验性 PVR 发生发展效果,报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

OMS-610 型手术显微镜 (日本 Topcon 公司);FDDnet216 眼底照相系统 (福州福达光电设备有限公司);B-SCAN A/B 型超声诊断仪 (法国光太公司);苦参碱聚乳酸微球及空白聚乳酸微球 (blank polyactic acid microsphere, blank-PLA-MS) 由河北医科大学药剂学教研室制备;苦参碱对照品由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 30 只健康成年新西兰白兔 (河北医科大学实验动物中心提供),体重 2.0~2.5 kg,雌雄不拘。用随机数字表法将动物分为 3 组:载药微球组,含苦参碱 4 mg,10 只兔 (20 只眼);游离药物组,含游离

苦参碱 2 mg,10 只兔 (20 只眼);对照组 10 只兔,左眼注入生理盐水 (10 只眼) 为生理盐水组,右眼注入空白微球悬液 (10 只眼) 为空白微球组。

1.2.2 实验操作 按文献 [6] 的方法培养同种异体成纤维细胞。所有实验用兔角膜缘后 2 mm 穿刺抽取玻璃体 0.3 mL,并向玻璃体腔中后部注入 2×10^5 个/0.1 mL 的同种异体成纤维细胞悬液,随机按分组分别注入载药微球生理盐水混悬液、游离苦参碱生理盐水溶液或生理盐水及空白微球混悬液 0.3 mL。

1.2.3 实验结果观察 所有动物玻璃体腔手术后第 1、3、7、14、21、28、35 天用裂隙灯显微镜观察眼前节炎症反应情况;用间接检眼镜、眼底彩色照相和 B 型超声检查玻璃体混浊情况、玻璃体腔内微球分解情况、玻璃体内增生情况、视网膜是否脱离以及脱离程度。

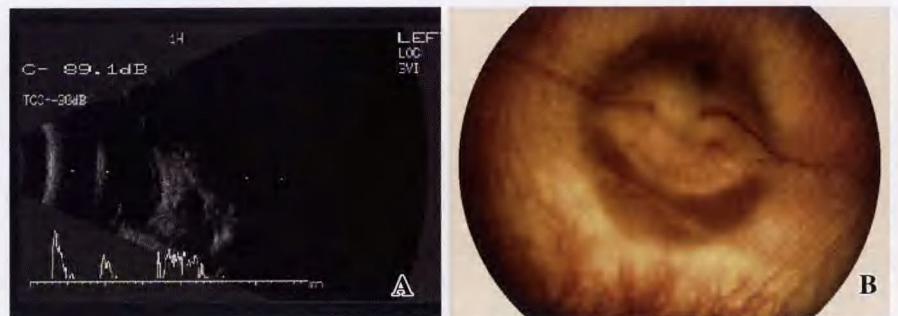


图 1 兔眼玻璃体腔注入成纤维细胞和游离苦参碱 14 d 示玻璃体增生条带 (PVR I 级) A: B 型超声检查 B: 眼底照相

Fig. 1 Rabbit eye on the 14th day in free matrine group showed the proliferative string in vitreous with PVR grade I A: B-type ultrasonic photograph B: fundus photograph

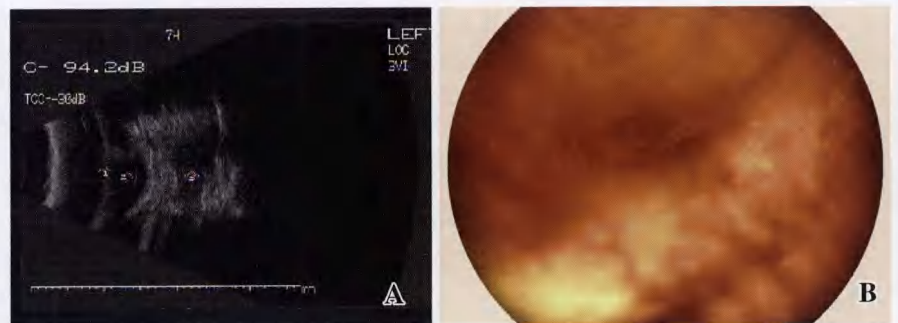


图 2 兔眼玻璃体腔注入成纤维细胞和 MAT-PLA-MS 21 d 示玻璃体混浊及增生条带 (PVR I 级) A: B 型超声检查 B: 眼底照相

Fig. 2 Rabbit eye on the 21st day in MAT-PLA-MS group showed opacity of vitreous and proliferative string in vitreous with PVR grade A: B-type ultrasonic photograph B: fundus photograph

按 Ryan 分级法,兔眼 PVR 共分 4 个等级:0 级:玻璃体无混浊,视网膜在位; I 级:玻璃体混浊并见增生条带; II 级:玻璃体增生条带牵拉至髓线抬高,或有局限性视网膜脱离; III 级:视网膜全脱离,或呈漏斗状脱离。II ~ III 级的总和占总数的百分率为视网膜脱离的发生率。

大体标本观察:在 35 d 观察期结束后,以 2% 利多卡因球后麻醉,爱尔凯因滴眼液表面麻醉后摘除双眼眼球,迅速以冰生理盐水冲洗,并在甲醛-冰醋酸-乙醇混合固定液中固定 48 h,平行于髓线方向切开眼球,进行大体标本的观察。

1.3 统计学方法

采用 SAS 8.1 统计学软件进行统计学分析。视网膜脱离的发生率以眼数和百分比表示,各组在不同时间点视网膜脱离发生率的比较采用 Fisher 精确概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 眼前节检查

所有实验动物眼接受玻璃体腔注射后角膜清亮、晶状体未出现混浊,1 周内前房有轻~中度的炎症反应,1 周后消失。

2.2 间接检眼镜及 B 型超声检查

2.2.1 游离药物组 玻璃体腔注射后即出现玻璃体雾状或絮状混浊,随观察时间的延长,部分实验眼趋向正常,部分发展为 PVR I ~ III 级(图 1)。

2.2.2 载药微球组 玻璃体腔注射后即出现白色颗粒样混浊+雾状或絮状混浊,随观察时间的延长,白色颗粒逐渐降解,部分实验眼趋向正常,部分发展为 PVR I ~ III 级(图 2)。

2.2.3 空白微球组 玻璃体腔注射后即出现白色颗粒样混浊+雾状或絮状混浊,随时间的延长,白色颗粒逐渐降解,眼底呈 PVR I ~ III 级改变(图 3)。

2.2.4 生理盐水组 玻璃体腔注射后即出现玻璃体雾状或絮状混浊,随观察时间的延长,逐渐发展到 PVR I ~ III 级(图 4)。

2.2.5 各组在不同时间点 0 ~ III 级 PVR 眼数分布情况见表 1。

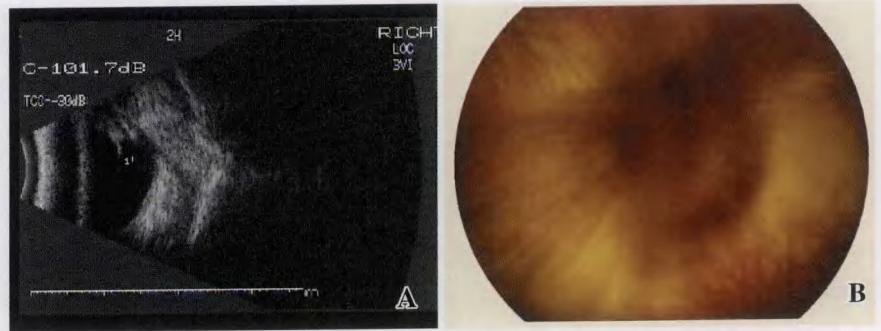


图 3 兔眼玻璃体腔注入成纤维细胞和 blank-PLA-MS 21 d 示玻璃体混浊及部分视网膜脱离 (PVR II 级) A;B 型超声检查 B:眼底照相

Fig. 3 Rabbit eye on the 21st day in blank-PLA-MS group showed opacity of vitreous and partial retinal detachment (PVR grade II) A; B-type ultrasonic photograph B: fundus photograph

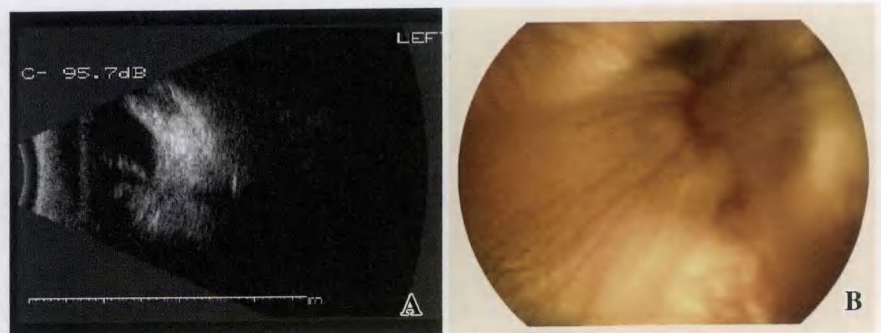


图 4 兔眼玻璃体腔注入成纤维细胞和生理盐水 28 d 示视网膜全脱离 (PVR III 级) A;B 型超声检查 B:眼底照相

Fig. 4 Rabbit eye on the 28th day in normal saline group showed total retinal detachment (PVR grade III) A; B-type ultrasonic photograph B: fundus photograph

表 1 各组在不同时间点 0 ~ III 级 PVR 眼数分布情况 (眼数)
Table 1 The situation of vitreous proliferation and retinal detachment after injection of fibroblast cells (Eyes)

Group	Eyes of PVR after injection						
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
NS							
PVR 0	0	0	0	0	0	0	0
PVR I	0	0	8	4	2	1	1
PVR II	0	0	0	4	3	3	1
PVR III	0	0	0	2	5	6	8
blank-PLA-MS							
PVR 0	0	0	0	0	0	0	0
PVR I	0	0	9	4	2	1	1
PVR II	0	0	0	5	3	2	1
PVR III	0	0	0	1	5	7	8
matrine							
PVR 0	0	0	0	0	5	4	4
PVR I	0	0	4	8	9	6	4
PVR II	0	0	0	2	5	6	6
PVR III	0	0	0	0	1	4	6
MAT-PLA-MS							
PVR 0	0	0	0	0	9	8	8
PVR I	0	0	3	7	9	9	9
PVR II	0	0	0	1	2	2	2
PVR III	0	0	0	0	0	1	1

各组在不同时间点视网膜脱离的发生率经过 SAS 8.1 统计学软件进行统计学处理,四格表精确概率法计算:游离药物组与对照组相比,除 35 d 外,其余各时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$);载药微球组与对照组相比,各时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$);载药微球组与游离药物组比较,28 d 和 35 d 时差异有统计学意义($P < 0.05$),其余各时间点差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。

表 2 各组在不同时间点视网膜脱离的发生率($n, \%$)

Table 2 The morbidity of retinal detachment after injection of fibroblast cells($n, \%$)

Group	N	Incidence of retinal detachment after injection			
		14 d	21 d	28 d	35 d
Blank-PLA-MS + NS	20	12(60%)	16(80%)	18(90%)	18(90%)
Free matrine	20	2(10%)	6(30%)	10(50%)	12(60%)
MAT-PLA-MS	20	1(5%)	2(10%)	3(15%)	3(15%)

$P < 0.05$ (Fisher Exact test)

2.3 大体标本观察

生理盐水组中 1 只眼表现为部分视网膜脱离,8 只眼为视网膜全脱离;游离苦参碱组中 6 只眼出现局限性视网膜脱离,6 只眼为视网膜全脱离;载药微球组 2 只眼出现局限性视网膜脱离,1 只眼为视网膜全脱离;空白微球组 1 只眼表现为部分视网膜脱离,8 只眼为视网膜全脱离。

3 讨论

PVR 的病理过程历经炎症期、增生期和瘢痕期,最终发生牵引性视网膜脱离,是一个以时相为特征的程序化过程:某种病变或刺激因子引起眼后节炎症反应,大量的细胞迁移至视网膜前和视网膜下,在玻璃体腔和视网膜下间隙分化增生,并有营养因子和细胞活素类物质的参与,形成纤维膜。增生膜的收缩易导致视网膜脱离,牵引性视网膜脱离一旦发生,又使血-视网膜屏障进一步遭到破坏,炎症反应加重,导致视网膜脱离进一步加重,如此形成恶性循环^[7-8]。PVR 增生膜的来源为视网膜色素上皮细胞、胶质细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和炎性细胞,此外一些营养因子和细胞活素类物质如转移生长因子、血小板衍生生长因子、肝细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、血管内皮细胞生长因子、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、IL-1、IL-6 和细胞外基质也参与了 PVR 的发病机制^[9]。

本实验采用玻璃体腔注射成纤维细胞诱发 PVR 模型,这是一种较早建立的成熟且广泛使用的方

法^[10]。抽出 0.3 mL 玻璃体后再注入成纤维细胞和药物,这样既扰动了兔眼玻璃体,造成眼后节的炎症反应,同时被破坏了正常结构的玻璃体又可以作为细胞增生的支架。这种方法造模的成功率高,本实验未被药物干预的动物 90% 的眼出现视网膜脱离,其余 10% 为 PVR I 级。

目前 PVR 的治疗以手术为主,玻璃体手术虽能切除已形成的增生膜,但不能完全去除增生细胞,甚至会刺激细胞的分化、增生,再次形成 PVR,造成术后复发。况且即使外科手术有着较高的解剖复位率,但视功能的改善并不理想^[2,11]。因此寻求药物预防和治疗 PVR 愈发受到关注。

苦参碱广泛存在于苦豆子、苦参、广豆根及山豆根等豆科槐属植物中,是其干燥根中提取的一种生物碱活性成分。近年的研究证实,其具有较强的抗增生、抗纤维化作用。苦参碱通过诱导成纤维细胞凋亡^[12]对多部位成纤维细胞的增生有明显抑制作用;转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是 PVR 发生发展过程中重要的细胞因子^[13],苦参碱具有抑制或下调 TGF- β 表达的作用^[14];苦参碱还可通过抑制蛋白激酶 C 的活性,抑制多种参与 PVR 形成的细胞因子^[15]。苦参碱的另一重要药理特性为抗炎作用,具有非甾体类抗炎药的特性。动物体内研究表明,苦参碱能有效地对抗眼部炎症^[16]。因此,苦参碱在 PVR 的炎症期和增生期均可发挥作用。

PVR 的发生发展是一个缓慢的动态过程^[17],而游离药物在玻璃体腔内半衰期短、消除快,单次注射难以维持治疗浓度,多次眼内注射则易引起眼内感染、出血、晶状体和视网膜损伤等多种并发症^[9-10],同时增加了患者的痛苦及治疗费用。而且普通制剂在眼内的浓度也会出现大幅度的波动,会因初始峰值浓度过高而对眼组织产生毒性,导致游离药物的安全剂量较小。因而药物缓释制剂在 PVR 的防治中备受青睐。本实验制备了苦参碱聚乳酸微球(含苦参碱 4 mg),注入 PVR 模型兔眼玻璃体腔,以游离药物 2 mg、生理盐水及空白聚乳酸微球作为对照,观察其抑制 PVR 发生发展的效果。

所有实验动物接受玻璃体腔注射后 1 周内眼前节均有轻~中度的炎症反应,1 周后基本消失,说明成纤维细胞悬液对眼前节有一过性的刺激反应。晶状体均未出现混浊,这与手术操作过程全部是通过手术显微镜和角膜接触镜在直视下完成有关。兔眼玻璃体腔注入成纤维细胞悬液后,玻璃体即呈现雾状或絮状混浊,注射后 3 d 对照组玻璃体雾状或絮状混浊加重,至 7 d

时继续加重,并开始出现增生条带,而游离药物组和载药微球组兔眼玻璃体雾状或絮状混浊较对照组轻,是药物干预的结果。此期为 PVR 的初期,即炎症反应期,大约持续 1 周,主要以血浆渗出、炎性细胞浸润、纤维素分泌为主,所以玻璃体混浊明显。14 d 时对照组所有兔眼均出现不同程度的 PVR,游离药物组和载药微球组兔眼玻璃体雾状或絮状混浊减轻,部分实验眼发生程度较轻的 PVR,用药组较对照组 PVR 的发生率明显降低。说明 7~14 d 为增生期,此期除了炎症因子继续作用外,由于各种生长因子的大量分泌,导致视网膜前和玻璃体内有大量细胞增生,PVR 形成,药物在增生期继续发挥抑制 PVR 发生发展的作用。21 d 时对照组 PVR 的程度加重,视网膜脱离的发生率已达 50%,用药组 PVR 的发生率较前增加,但与对照组相比却明显降低,未出现玻璃体增生的用药组动物眼玻璃体雾状或絮状混浊消失,说明 PVR 发展进入瘢痕化的过程,此时表现为胶原及其他各种细胞外间质成分合成为主,细胞成分减少,最终膜收缩导致牵拉性视网膜脱离。在此期间,载药微球组的视网膜脱离发生率低于游离药物组,但差异无统计学意义。28 d 和 35 d 时,对照组和游离药物组 PVR 程度仍继续加重,而载药微球组则无明显变化,载药微球组的视网膜脱离发生率明显低于游离药物组,差异有统计学意义。这与游离药物半衰期短,在玻璃体腔内无法长期维持有效治疗浓度有关,而载药微球组药物持续发挥抑制 PVR 发生发展的作用。

由此可见,苦参碱通过其类似于糖皮质激素类药物的抗炎特性在 PVR 的炎症期发挥作用,又由于其显著的抗增生、抗纤维化功能在增生期发挥效应,同时苦参碱还针对 G⁺ 球菌、G⁻ 杆菌等多种细菌具有明显的抑菌作用,降低了玻璃体腔注射造成眼内感染的风险^[18]。药物缓释制剂苦参碱聚乳酸微球可以使玻璃体腔内的药物浓度在较长时间内保持在较高而稳定的治疗水平,提高了药物的生物利用度,对于 PVR 这样一种发展较为缓慢的疾病来说更具治疗意义和应用前景。

参考文献

- 1 Asaria RH, Charteris DG. Proliferative vitreoretinopathy: developments in pathogenesis and treatment[J]. *Compr Ophthalmol Update*, 2006, 7: 179 - 185
- 2 Charteris DG, Sethi CS, Lewis GP, et al. Proliferative vitreoretinopathy - developments in adjunctive treatment and retinal pathology [J]. *Eye*, 2002, 16: 369 - 374
- 3 Kon CH, Oceleston NL, Aylward CW, et al. Expression of vitreous cytokines in proliferative vitreoretinopathy: a prospective study[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 705 - 712
- 4 金玉, 张宏文. 苦参碱及氧化苦参碱的抗纤维化作用研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2004, 5: 493 - 494
- 5 刘丹岩, 马景学, 安建斌, 等. 苦参碱聚乳酸微球玻璃体内注射的药代动力学研究[J]. *眼科研究*, 2009, 27(10): 833 - 838
- 6 Berger AS, Cheng CK, Pearson PA, et al. Intravitreal sustained release corticosteroid-5-fluoruracil conjugate in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37: 2318 - 2325
- 7 Baudouin C, Khosrvi E, Pisella PJ, et al. Inflammation measurement and immunocharacterization of cell proliferation in an experimental model of proliferative vitreoretinopathy [J]. *Ophthalmic Res*, 1998, 30: 340 - 350
- 8 Machemer R. Proliferative Vitreoretinopathy (PVR): A personal account of its pathogenesis and treatment [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 29: 1771 - 1783
- 9 Ikuno Y, Leong FL, Kazlauskas A, et al. Attenuation of experimental proliferative vitreoretinopathy by inhibiting the platelet-derived growth factor receptor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41: 3017 - 3116
- 10 Ophir A, Blumenkranz M, Claffin AJ. Experimental intraocular proliferation and neovascularization [J]. *Am J Ophthalmol*, 1982, 94: 450 - 457
- 11 Roldan M, Rollin R, Mediero A, et al. Immunoreactive ET-1 in the vitreous humor and epiretinal membranes of patients with proliferative vitreoretinopathy [J]. *Mol Vis*, 2005, 11: 461 - 471
- 12 姜孟臣, 陈虹, 刘洪琪, 等. 苦参碱对人增生性瘢痕成纤维细胞增生的体外抑制作用 [J]. *中草药*, 2005, 36: 89 - 91
- 13 Bochaton PML, Kapetanios AP, Donati G, et al. TGF- β , TGF- β receptor II and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41: 2336 - 2345
- 14 朱梁, 宋健, 张兴荣, 等. 苦参碱对成纤维细胞增生、形态学及转化生长因子 β 1 的影响 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2000, 19: 461 - 463
- 15 Hu ZL. Effect of matrine on mouse splenocyte proliferation and release of interleukin-1 and -6 from peritoneal macrophages in vitro [J]. *Acta Pharmacol*, 1996, 17: 256 - 263
- 16 郑马庆, 潘伟娜, 朱延勤. 苦参碱滴眼液对家兔实验性眼炎的药理学研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2003, 14: 109 - 111
- 17 Wiedemann P, Hilgers RD, Bauer P, et al. Adjunctive daunorubicin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy: results of a multicenter clinical trial. *Daunomycin Study Group* [J]. *Am J Ophthalmol*, 1998, 126: 550 - 559
- 18 樊宏伟, 卢继红, 张蓉. 苦参碱类生物碱的体外抑菌、抑病毒及诱生干扰素的实验研究 [J]. *中医药信息*, 2000, 17: 75 - 76

(收稿: 2009-06-26 修回: 2009-09-15)

(本文编辑: 尹卫靖)

读者·作者·编者

本刊关于网上投稿的启事

本刊已实行网上审稿、网上退修等,欢迎广大作者从网上投稿。单位介绍信和图片仍请邮寄。没有条件上网的作者投稿时请附光盘。本刊电子信箱: ykyjzz@yahoo.com.cn

(本刊编辑部)