

FK506 (他克莫司)滴眼后在兔眼组织中的分布研究

刘永民 陈家祺

【摘要】 目的 探讨 FK506 (他克莫司)滴眼液表面应用后在眼前段组织和房水中的分布。**方法** 配制 0.05%、0.1%、0.2%、0.4%FK506 滴眼液。在滴眼后不同的时间点,应用酶联免疫测定法测定房水、角膜、结膜和虹膜中的 FK506 浓度。**结果** 0.05%FK506, 1h 房水药物浓度达到高峰,峰值是 $18.93 \pm 6.95\text{ng/ml}$ 。0.1%FK506 峰值在 2h, 房水药物浓度是 $28.33 \pm 9.31\text{ng/ml}$ 。4 种不同浓度的滴眼液滴眼后 1h, 结膜、角膜中的 FK506 浓度为 $43.52\text{ng/g} \sim 123.35\text{ng/g}$ 、虹膜中 $8.85\text{ng/g} \sim 21.76\text{ng/g}$ 、房水中 $18.90 \sim 33.55\text{ng/ml}$ 。各种浓度滴眼液滴眼后 2.5h, 角膜中的 FK506 浓度为 $41.75\text{ng/g} \sim 118.29\text{ng/g}$, 房水中为 $8.35\text{ng/ml} \sim 27.85\text{ng/ml}$, 结膜和虹膜中的含量明显减少。**结论** 我们配制的 FK506 滴眼液,具有良好的眼部穿透性,在房水、角膜和结膜中均可以达到有效的治疗浓度,可以用来治疗眼表或眼前段免疫相关性疾病。

【关键词】 FK506 (他克莫司); 分布; 滴眼液; 酶联免疫测定

Distribution of FK506 In Ocular Tissues after Topical Administration to Rabbit Eyes LIU Yong-min, CHEN Jia-qi*. Dongguan Guangming Ophthalmic Hospital, 14 Xiangyang Road, Dongguan 523007, China. *Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

【Abstract】 Objective To investigate the ocular distribution of FK506 (tacrolimus) after topical ophthalmic administration. **Methods** 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4% FK506 eye drops were prepared. The concentrations of FK506 in the aqueous humor, cornea, conjunctiva and iris were measured by immunoassay after that two drops of 20ul FK506 of different concentrations were topically applied at different time. **Results** The peak concentration of FK506 in aqueous humor was $18.93 \pm 6.95\text{ng/ml}$ at about 1 hour after topical application of 0.05% FK506 and was $28.33 \pm 9.31\text{ng/ml}$ at 2 hour after topical application of 0.1% FK506. The concentration of FK506 in tissues and humor increased following the increase of the concentration of FK506 eye drops. For all kinds of eye drops at 1 hour after topical application, the concentration of FK506 was higher in cornea and conjunctiva (43.52ng/g to 123.35ng/g), followed was humor (18.90ng/ml to 33.55ng/ml) and iris (8.85ng/g to 21.76ng/g). High concentrations (41.75ng/g to 118.29ng/g) could still be detected in the cornea at 2.5 hour, then in humor (8.35ng/ml to 27.85ng/ml), and lower concentrations were found in conjunctiva and iris. **Conclusions** The FK506 eye drops prepared with our methods has a high ocular penetrating ability and can reach therapeutic concentration in cornea, conjunctiva and aqueous humor. They can be used to treat immune diseases of anterior segment or eye surface.

【Key words】 FK506 (tacrolimus); eye drops; distribution; immunoassay

移植排斥仍是角膜移植失败的常见原因,尽管应用免疫抑制剂,仍有 10%~30%的角膜移植发生排斥^[1]。在移植排斥高危的角膜移植病例中,如角膜广泛新生血管和因植片排斥而再移植病人,角膜移

植术后排斥的发生率高达 50%^[2,3]。目前预防和治疗角膜移植排斥的药物主要是皮质类固醇和环孢霉素 A(cyclosporine A, CSA)。皮质类固醇治疗移植排斥反应,仅有约 50%病人有效。对于严重血管化的角膜,无论在治疗方面,还是在预防方面,皮质类固醇都是无能为力的。目前临床显示局部应用 CSA 预防和治疗角膜移植排斥需要进一步研究,全身应用效果肯定但副作用大^[3,4]。

作者单位: 523007 东莞, 东莞光明眼科医院 (刘永民); 广州中山眼科中心 (陈家祺)
通讯作者: 陈家祺

FK506 (tarolimus) 是一种来源于真菌的大环内酯类物质, 是较强的特异性免疫抑制剂。体外实验证实, 它是通过抑制混合淋巴细胞反应和细胞毒性 T 细胞来发挥免疫抑制作用, 它的免疫抑制强度是 CSA 的 10~100 倍^[5-7]。

FK506 已经广泛用于预防和治疗肝脏等器官移植的排斥反应。动物及临床实验证实全身应用 FK506 可有效治疗自身免疫性葡萄膜炎^[8-10]。实验和临床证实全身和局部用药可预防和治疗角膜移植排斥^[11-15]。为了研究 FK506 表面用药后在眼部的分布特征、选择合适的滴眼液浓度和为药效学研究提供理论基础, 我们开展了此项研究。现将研究结果报告如下:

材料与方法

一、动物

体重为 (2.8~3.2) kg、健康的新西兰白兔 (中山大学实验动物中心提供), 实验前检查眼部无任何疾病, 然后分组。

二、滴眼液的制备

原料应用普乐可复注射液 (Prograf®), Fujisawa Ireland Ltd.), 每支 1ml, 含 5mg FK506、20% 聚乙烯氢化蓖麻油和 80% 纯酒精。除去针剂中的酒精, 然后用 0.1% 羟甲基纤维素配制成 0.05%、0.1%、0.2%、0.4% FK506 滴眼液。

三、给药方法

用微量加样器点滴 20 μ l FK506 滴眼液于角膜表面, 5min 后追加一次。

四、FK506 的局部副作用和血液吸收情况观察

观察表面应用不同浓度 FK506 滴眼液后的眼部体征、组织学改变和血液吸收情况。每种浓度的 FK506 滴 4 只兔, 共 16 只。右眼滴 FK506, 每天 4 次, 另眼表面应用 0.1% 羟甲基纤维素作对照。每天用裂隙灯观察眼部体征。用药后 10min、30min 和之后每 1h 观察 1 次, 持续 6h。持续 3d 后, 分别采集角膜和心脏血。用投射和扫描电子显微镜观察角膜上皮、内皮和基质细胞的细胞器、连接和基质纤维。用微粒酶免疫试验 (Microparticle enzyme immunoassay, MEIA; Tacrolimus-II, IMx[®], Abbott Laboratories) 测定全血中 FK506 浓度。

五、FK506 表面应用后在眼前段组织中含量测定

4 种不同浓度的 FK506 滴眼液表面应用后在眼前段组织中的含量比较: 32 只兔, 每种浓度每个时

间点滴 4 只, 用于测定 4 种不同浓度 FK506 滴眼液分别在用药后 1h 和 2.5h 的房水、结膜、角膜和虹膜中的药物含量。每只兔一眼滴 FK506, 另一眼滴 0.1% 羟甲基纤维素, 每种浓度的滴眼液滴 4 只兔。

表面应用 0.05% 和 0.1% FK506 后, 在不同时间点房水中 FK506 的浓度变化: 0.05% 和 0.1% FK506 滴眼液分别滴 24 只兔, 每个时间点每种浓度滴 4 眼, 一次滴一眼。在最后一次滴眼后 0.5h、1h、2h、2.5h、3h、4h 分别抽取房水 (每眼仅抽一次), 然后测定房水中 FK506 浓度。

(一) 样本的采集

房水样本的制备: 肌肉注射氯胺酮及氯丙嗪麻醉后, 用生理盐水冲洗结膜囊, 然后用 1ml 一次性注射器从角膜缘进行前房穿刺制备房水样本, 样本放在 -18 $^{\circ}$ C 冰箱中冷冻保存。

组织样本的制备: 用气体栓塞方法处死动物, 然后用刀片刮除角膜上皮, 生理盐水冲洗结膜囊, 抽取房水。用棉签吸干结膜囊的水分, 用显微剪取角膜、虹膜和部分球结膜, 然后用生理盐水冲洗, 滤纸吸干水分后放在 1.5ml 试管中, 盖上盖子。尽快放在电子天平上称重, 然后转移到 8ml 玻璃试管中, 加二氯甲烷 5ml, 用显微剪充分剪碎组织。用离心机离心 10min 后, 取底层二氯甲烷 4.5ml 于另一试管中, 用氮气吹干。封闭试管口, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。对照眼用同样的方法处理。

(二) 检测方法

该方法是一种应用 FK506 单克隆抗体的敏感的竞争酶免疫测定技术。这种方法是在已经包埋羊抗鼠 IgG 的微滴度板 (DiaSorin Inc.) 中进行。

根据兔房水成分配制人工兔房水, 用人工房水把标准品 (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd.) 稀释到一定浓度后, 再用兔房水配制成 5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml 的标准浓度。

FK506 的房水浓度测定: 对照分为已知 FK506 浓度对照、阳性对照、人工房水对照。阳性对照不加单克隆抗体。标准、对照和样品 (各 20 μ l) 从已准备好的 300 μ l 蛋白酶、皂角苷和钙的混合反应物 (DiaSorin Inc.) 中提取, 然后取 100 μ l 上清液加到微滴度板的孔中。接着加入抗 -FK506 单克隆抗体 (DiaSorin Inc.) 50 μ l, 阳性对照不加抗 -FK506 单克隆抗体而是加 50 μ l 结合物的稀释液。室温孵育 30 分钟后, 加入 50 μ l 稀释的 FK506-辣根过氧化物酶结合物 (DiaSorin Inc.) 并孵育 60 分钟。用冲洗液 (DiaSorin Inc.) 冲洗每个孔, 然后加入色素原四羟

甲基联苯胺(DiaSorin Inc.)200 μ l并孵化15分钟。加入2N硫酸100 μ l终止反应。应用读数仪(Bio Tek EL312e)的双波长450/630nm阅读吸收情况。颜色的深浅与样品中的FK506的量成反比。浓度通过标准曲线读出:房水对数浓度=(吸收度-截距)/斜率。然后把房水对数浓度转化为普通浓度(ng/ml)。每测定一次,都需要有一个标准曲线。图1是其中一个以标准浓度制备的标准曲线。

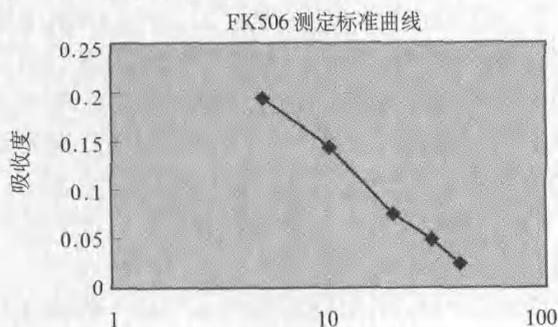


图1 FK506测定标准曲线, FK506浓度与吸收度呈负相关, 相关系数是-0.998

组织中FK506含量的测定: 在从眼组织中提取FK506的试管中加入兔房水200 μ l, 用涡旋机充分混合。对照眼用同样方法处理。以后操作步骤同房水中的FK506测定。组织中的含量(ng/g) = 测定浓度(ng/ml) \times 0.2 (ml) / 组织重量(g)。

(三) 质量控制

该方法可以测定的FK506最低浓度是0.2ng/ml (PRO-Trac™ Tacrolimus ELISA Kit, DiaSorin, USA)。阳性对照(不加抗FK506血清)的吸收度=0.007, 明显小于0.05 (40ng/ml FK506标准浓度的吸收度)。零标准和人工房水的吸收度分别是0.922和0.867。对照样本的测定在变异范围之内。3次测定中, 标准浓度和吸收度的相关系数分别是: -0.993、-0.998、-0.998。每个样品的两个孔的测定值的差不超过15%。

(四) 数据换算及统计学方法

应用Microsoft Excel软件进行标准曲线制作及浓度计算。应用SPSS8.0两个独立样本均数比较T检验来统计表面应用不同浓度FK506滴眼液后房水中FK506浓度之间的差异。P<0.05则认为有显著差异。

结 果

一、用药后眼部体征和组织学情况

眼部裂隙灯显微镜体征: 0.4% FK506滴眼液可引起轻度球结膜充血, 3h~4h完全消失, 未见角

膜水肿及前房反应。其余滴眼液未见眼部副作用。

电镜观察: 角膜上皮和内皮微绒毛、细胞器、细胞连接、基质层纤维间隙与正常对照未见异常。

二、房水浓度的测定结果

0.05%和0.1% FK506滴眼液滴眼后, 在0.5h、1.0h、2.0h、2.5h、3.0h和4.0h抽取房水(每只兔只能抽一个时间点的房水)。每个时间点每种浓度滴眼液测定样本5个。结果显示0.05%FK506滴眼液滴眼后1h, 房水中的药物浓度达到峰值 18.93 ± 6.95 ng/ml, 在4小时房水中测不到FK506。0.1% FK506滴眼液滴眼后的房水高峰值在2h, 浓度是 28.33 ± 9.36 ng/ml, 在4h是 3.95 ± 3.55 ng/ml。(图2)

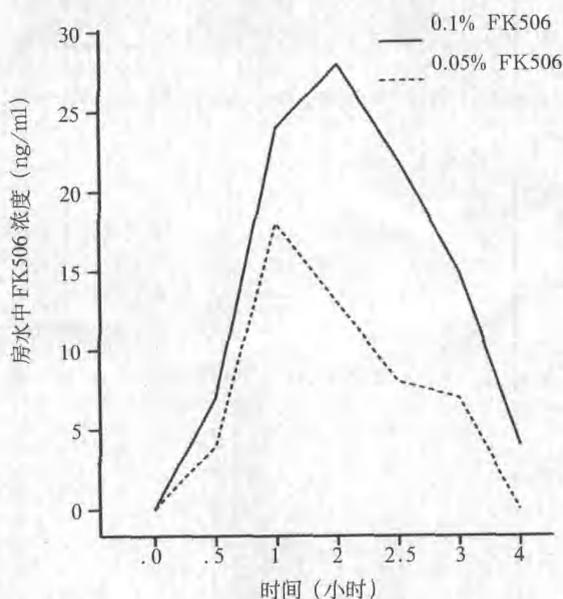


图2 0.05%和0.1%FK506滴眼液滴眼后, 房水中的FK506浓度在不同时间点的变化

0.05%、0.1%、0.2%、0.4% FK506滴眼后1h, 房水中FK506浓度分别是 18.90 ± 6.95 ng/ml、 24.50 ± 10.20 ng/ml、 28.65 ± 12.34 ng/ml、 33.55 ± 15.21 ng/ml。2.5h, 房水中的FK506浓度分别是 8.35 ± 6.93 ng/ml、 22.3 ± 8.09 ng/ml、 24.11 ± 8.38 ng/ml和 27.85 ± 10.17 ng/ml。

三、眼部组织中的FK506含量

表面应用4种不同浓度的FK506滴眼液后1h, 结膜、角膜中的FK506含量为43.52ng/g~123.35ng/g, 虹膜中的为8.85ng/g~21.76ng/g(图3)。滴眼后2.5h, 角膜中的FK506浓度为41.75ng/g~118.29ng/g, 房水中的为8.35ng/ml~27.85 ng/ml, 结膜和虹膜中的含量明显减少。对照眼的浓度均小于0.2ng/g(图4)。

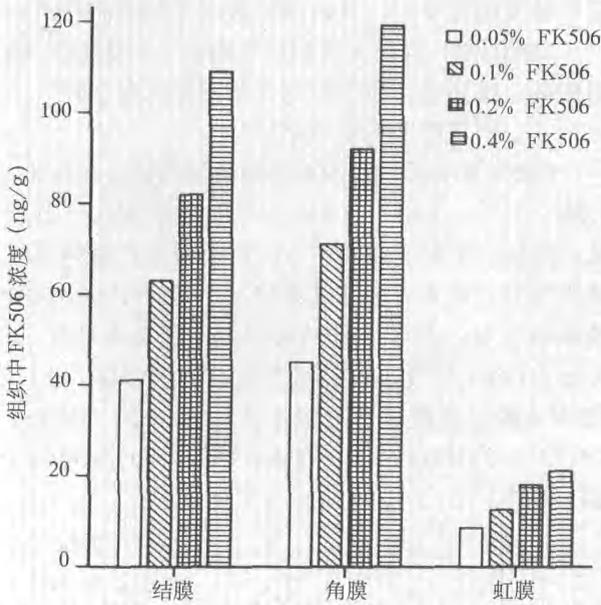


图 3 4 种不同浓度的 FK506 滴眼液表面用药后 1 小时在眼组织中的含量

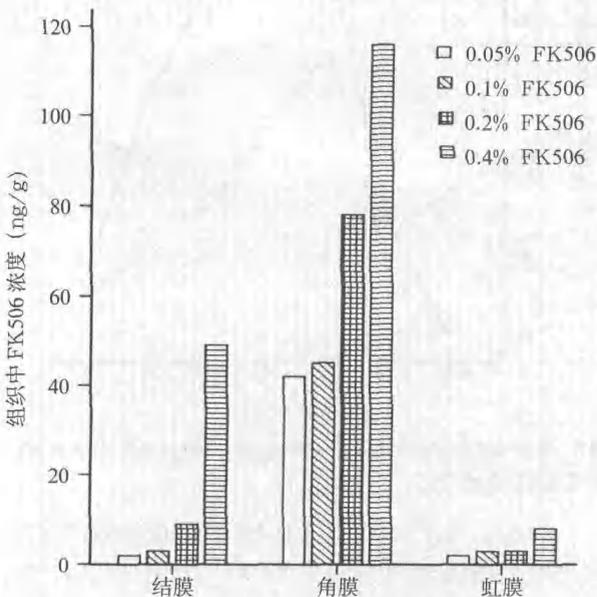


图 3 4 种不同浓度的 FK506 滴眼液表面用药后 2.5 小时在眼组织中的含量

讨 论

在表面用药方面,糖皮质类固醇目前仍是治疗眼表及眼前段过敏性、自身免疫性疾病和角膜移植排斥等免疫相关性疾病的最有效药物。由于糖皮质类固醇长期用药的副作用如皮质类固醇性青光眼和白内障、抑制角膜上皮和伤口的愈合、组织萎缩等,在寻找它的替代药物方面曾应用 CSA。虽然 CSA 可以有效治疗一些眼表的免疫相关性疾病,但是研究发现目前的 CSA 制剂表面应用的眼部穿透力差,对

眼部较深组织的免疫抑制主要靠全身用药,如排斥高危险性角膜移植。

FK506 是疏水性的大环内酯类免疫抑制剂的家族成员之一,这个家族包括 CSA、雷伯霉素(rapamycin)等。这类物质通过和细胞内的特异性配体-免疫亲和蛋白(immunophilins)结合发挥作用。作用部位在 T 淋巴细胞激活过程中的特异性的配体和早期的基因转录之间^[16,17]。

Kobayashi^[13]最早报道结膜下注射 FK506 有明显延长兔同种异体角膜移植生存时间的作用。由于 FK506 是亲脂性大分子(分子量是 822D),它有和 CSA 类似的眼部穿透能力差的特性。因此,在表面用药方面主要集中在探讨应用何种载体。

一、以往关于 FK506 滴眼液的研究成就和局限性

Pleyer^[18]分别用脂质体和橄榄油作载体配制 0.48% FK506 滴眼液,表面用药(每次 20 μ l,共 2 次,间隔 5 分钟)后 30、60、120min,观察 FK506 在兔眼部的穿透性。脂质体组在任何时间点眼部组织中的 FK506 浓度均较高,房水中是 5~28ng/g,玻璃体中是 12~22ng/g。油剂组房水和玻璃体中的含量是 0.2~1.0ng/g。

Whitcup^[12]应用 0.16%FK506 脂质体和 0.3% FK506 油剂滴眼液预防内毒素诱导的葡萄膜炎,病理检查发现两者均明显抑制炎症的发生,而且两者之间无显著差异。

以上研究显示脂质体作载体可以增加 FK506 的穿透性,因此可减少滴眼液的药物浓度,但是它的配制复杂和不稳定性限制了它的临床应用。

Mills^[14]应用兔作动物模型进行同种异体角膜移植,移植后分别表面应用 FK506,分 0.3%FK506 环糊精悬浊液组、环糊精滴眼液组和非治疗组,观察 100 天。0.3%FK506 组约 8~10 周发生排斥,排斥率是 25%;其它两组排斥发生在平均第 3 周,排斥率分别是 71%和 88%。0.3%FK506 组和其它两组间在统计学上有显著差异($p < 0.005$)。环糊精是一种环状的寡糖,带有亲水性的外部结构,因此可以作为亲脂性药物(如 CSA 和 FK506)的载体。

Hikita^[11]分别应用 0.05%、0.3%FK506 混悬液治疗内毒素诱导的葡萄膜炎,仅 0.3%FK506 有显著减轻炎症的作用。两组房水中的 FK506 浓度分别是 0.84ng/ml 和 2.0ng/ml。该研究也未测定血液中的 FK506 浓度,因此不能排除 0.3%FK506 吸收后的全身作用。

Pleyer 和 Whitcup 的研究说明脂质体作为载体可以增加 FK506 的穿透性。Mills 和 Hikita 的研究中, FK506 浓度相同, 都是每天 4 次, 载体不同, 都有显著的治疗效果, 没有测定血液和组织中的药物浓度, 因此不能确定是药物吸收后的全身作用, 还是两种滴眼液的浓度高而在组织中达到有效治疗浓度。我们也进行了不同浓度 FK506 滴眼液治疗大鼠角膜移植排斥模型的研究(待发表), 分别用我们配制的 0.05% 和 0.1% FK506 滴眼液, 每天 4 次, 滴眼 60 天后, 前者全血中的 FK506 浓度测不到, 而后者可以达到有效治疗浓度 ($>5\text{ng/ml}$)。

总结以往的研究, FK506 滴眼液的表面用药可以预防和治疗眼前段免疫相关性疾病。但以往的研究中, FK506 滴眼液浓度高, 不能排除全身吸收发挥作用。

二、该研究的结果及其可能的机制

我们配制的滴眼液是应用 Prograf[®] 作原料, 内含聚乙烷氢化蓖麻油(HCO60)。HCO60 是一种表面活性剂, 它可以使 FK506 既溶于水又溶于脂质, 因此 FK506 可以穿透角膜上皮和内皮又可以穿透基质, 具有良好的眼部穿透性。结果显示, 该研究中的各种浓度的 FK506 滴眼液滴眼后, 在组织中的浓度均可以达到体外实验或临床应用的治疗浓度^[19]。

器官移植和自身免疫性疾病的临床治疗证实, FK506 的血液浓度维持在 5 ~ 20ng/ml 时, 既可减少毒性反应, 又能预防和治疗排斥反应及自身免疫性疾病^[20]。

在各浓度组和不同时间点, 角膜中含量最高, 提示用药后角膜有储存药物的作用。结膜和虹膜中 FK506 含量在用药后 2.5 小时与 1 小时相比明显减少。可能是结膜和虹膜血液供应丰富, FK506 血液吸收快, 因此含量很快降低。

该研究的局限性: 标准曲线是从 0 ~ 40ng/ml 的标准 FK506 浓度得到的。因此, 如果组织或房水中的 FK506 含量超过 40ng/g 或 40ng/ml, 可能会出现误差。解决的办法是成倍稀释后再次测定。另外, 未测定组织中的 FK506 提取率, 实际组织的含量可能更高。但是该研究的目的是观察组织和房水中的 FK506 浓度能否达到治疗浓度, 因此未进一步测定。

结论: 我们配制的 FK506 滴眼液在眼前段组织和房水中有较好的穿透性。0.05% 和 0.1% FK506 滴眼液完全可以用来治疗眼前段和眼表的免疫相关性疾病。

参 考 文 献

- 1 Lindstrom RL. Advances in corneal transplantation. *N Engl J Med* 1986;315:1-9
- 2 Reinhard T, Sundmacher R, Heering P. Systemic cyclosporin A in high risk keratoplasties. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234:115-121
- 3 Hill JC. Systemic cyclosporin in high-risk keratoplasty. Short- versus long-term therapy. *Ophthalmology* 1994; 101(1): 128-33
- 4 Reis A, Reinhard T, Voiculescu A, et al. Mycophenolate mofetil versus cyclosporin A in high risk keratoplasty patients: a prospectively randomised clinical trial. *Br J Ophthalmol* 1999; 83(11):1268-71
- 5 Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Immunol Today* 1992;13: 136-142
- 6 Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, et al. Novel immunosuppressive agent, FK506: in vitro effects on the cloned T cell activation. *J Immunol* 1987; 40:1249-1255
- 7 Busuttil RW, Holt CD. Tacrolimus(FK506) is superior to cyclosporin in liver transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29:534-538
- 8 Mochizuki RW, Ikeda E, Shirao M, et al. Preclinical and clinical study of FK506 in uveitis. *Curr Eye Res* 1992; 11(Suppl):87-95
- 9 Sloper CM, Powell RJ, Dua HS. Tacrolimus (FK506) in the treatment of posterior uveitis refractory to cyclosporine. *Ophthalmology* 1999;106(4):723-728
- 10 Whitcup SM, Pleyer U, Lai JC, et al. Topical liposome encapsulated FK506 for the treatment of endotoxin induced uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 1998; 6(1):51-56
- 11 Hikita N, Lopez JS, Chan CC, et al. Use of topical FK506 in corneal graft rejection model in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(5):901-909
- 12 Whitcup SM, Pleyer U, Lai JC, et al: Topical liposome-encapsulated FK506 for the treatment of endotoxin-induced uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 1998; 6(1):51-6
- 13 Kobayashi C, Kanai A, Nakajima A, et al. Suppression of corneal graft rejection in rabbits by a new immunosuppressive agent, FK-506. *Transplant Proc.* 1989 Feb;21(1 Pt 3):3156-8
- 14 Mills RA, Jones DB, Winkler CR, et al. Topical FK-506 prevents experimental corneal allograft rejection. *Cornea* 1995;14(2):157-60
- 15 Xie H, Chen J, Lin Y, et al. [Effect of FK506 eye-drop combined with keratoplasty on recurrent Mooren's ulcer] *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2002;38(1):13-5
- 16 Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.*1992; 357:695-697
- 17 Sigal NH, Dumont FJ. Cyclosporin A, FK506, and rapamycin: pharmacological probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:519
- 18 Pleyer U, Lutz S, Juske WJ, et al. ocular absorption of topically applied FK506 from liposomal and oil formulations in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2737-2742
- 19 Yoshimura N, Marsui S, Hamashima T, et al. Effect of a new immunosuppressive agent, FK506, on human lymphocyte responses in vitro. *Transplantation* 1989; 47:351-359
- 20 Laskow D, Vincenti F, Neylan J, et al. Phase II FK506 multi-center concentration control study: one year follow up. *Transpl Proc* 1995; 27: 809-811

(收稿时间: 2006-07)