

## · 实验研究 ·

# 塞来昔布-聚乳酸-羟基醋酸共聚物微球的缓释性及其对实验性脉络膜新生血管抑制作用的在体研究

陈鹏飞 郝玉华 杨娜 安建斌 刘丽娅 马景学

050000 石家庄,河北医科大学第二医院眼科

通信作者:郝玉华,Email:yuhuasj@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.003

**【摘要】** 背景 脉络膜新生血管(CNV)是多种眼底病变共同的病理基础,虽然以往有多种方法进行治理,但均有其缺点。研究表明,塞来昔布可以治疗实验性 CNV,而寻求塞来昔布新的剂型和给药途径可为临床上研发治疗 CNV 疾病的缓释药物提供依据。目的 评价体外释放实验中塞来昔布-聚乳酸-羟基醋酸共聚物微球(CEL-PLGA-MS)的缓释性能及其玻璃体腔注射后对实验性 CNV 的抑制作用。方法 采用扫描电子显微镜观察 CEL-PLGA-MS 的形态,用激光粒度分析仪测量其粒径,应用高效液相色谱法(HPLC)测定其载药量及体外释放情况。选取 72 只雄性棕色挪威(BN)大鼠,用氩激光光凝法建立大鼠右眼 CNV 模型,将模型眼按照随机数字表法随机分为 CEL-PLGA-MS 组、塞来昔布组、空白 PLGA 组和 PBS 组,每组 9 只大鼠。根据分组的不同,大鼠玻璃体腔分别注射 8  $\mu$ l 含塞来昔布 320  $\mu$ mol/L PLGA 微球、80  $\mu$ mol/L 塞来昔布、空白 PLGA 微球及 0.01 mol/L PBS。于玻璃体腔注射后 14 d,采用荧光素眼底血管造影(FFA)法观察各组大鼠 CNV 生成情况,OCT 测量各组视网膜脉络膜纤维血管增生(FVP)厚度,制备视网膜色素上皮(RPE)-脉络膜-巩膜复合物标本,光学显微镜下观察各组大鼠 FVP 的形态结构。分别于玻璃体腔注射后 7 d、28 d,采用逆转录 PCR(RT-PCR)法测定并比较各组大鼠激光斑区域血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 和环氧合酶 2(COX-2)mRNA 的相对表达量(RQ)。结果 CEL-PLGA-MS 的平均粒径为 2 467.9 nm,平均载药量为 7.77%,体外释放可持续 45 d,累积释放百分率为 80.91%。玻璃体腔注射后 CEL-PLGA-MS 在玻璃体中呈团状。注射后 14 d,OCT 测量显示空白 PLGA 组、PBS 组、塞来昔布组和 CEL-PLGA-MS 组平均 FVP 厚度值分别为(94.67 $\pm$ 4.64)、(98.56 $\pm$ 4.72)、(71.00 $\pm$ 4.77)、(50.44 $\pm$ 3.01)  $\mu$ m,其中空白 PLGA 组和 PBS 组大鼠平均 FVP 厚度值均明显高于 CEL-PLGA-MS 组和塞来昔布组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),CEL-PLGA-MS 组平均 FVP 厚度值明显低于塞来昔布组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。FFA 晚期可见空白 PLGA 组和 PBS 组视网膜光凝斑区大量荧光素渗漏,呈强荧光,而塞来昔布组和 CEL-PLGA-MS 组荧光素渗漏量少。光学显微镜下视网膜光凝斑区中空白 PLGA 组和 PBS 组纤维血管组织较塞来昔布组和 CEL-PLGA-MS 组厚。玻璃体腔注射后 7 d 及 28 d 空白 PLGA 组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜标本中 COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA 的 RQ 值均明显高于塞来昔布组和 CEL-PLGA-MS 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ );玻璃体腔注射后 7 d 塞来昔布组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜标本中 COX-2 mRNA RQ 值明显低于 CEL-PLGA-MS 组,而注射后 28 d 塞来昔布组 COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA RQ 值均明显高于 CEL-PLGA-MS 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。结论 CEL-PLGA-MS 形态规则,粒径均匀,体外实验有良好的缓释效果;大鼠玻璃体注射 CEL-PLGA-MS 后能抑制实验性 CNV,其抑制作用较塞来昔布更持久。

**【关键词】** 塞来昔布;聚乳酸-羟基醋酸共聚物;缓释微球;脉络膜新生血管

**基金项目:**河北省医学科学研究重点课题计划项目(20120069)

**The sustained releasing ability of CEL-PLGA-MS *in vitro* and its inhibitory effects on experimental choroidal neovascularization after intravitreal injection** Chen Pengfei, Hao Yuhua, Yang Na, An Jianbin, Liu Liya, Ma Jingxue

Department of Ophthalmology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: Hao Yuhua, Email: yuhuasjz@sina.com

**[Abstract] Background** Choroidal neovascularization (CNV) is a common pathological basis of many ocular fundus diseases. Some treating methods are proved to be effective on CNV but there exist their own shortages. Celecoxib can inhibit experimental neovascularization. Sustained release drug of celecoxib and application approach can offer a basis for the therapy of CNV. **Objective** This study was to evaluate the sustained release ability of celecoxib-poly lactide-co-glycolide microsphere (CEL-PLGA-MS) *in vitro* and its inhibitory ability on experimental CNV *in vivo*. **Methods** CEL-PLGA-MS was prepared by Hebei Medical University and examined under the scanning electron microscope. The size of CEL-PLGA-MS was measured by Laser Particle Size Analyzer. The drug-loading *in vitro* releasing was monitored by high performance liquid chromatograph (HPLC). Experimental CNV was induced by laser photocoagulation of retina in the right eyes of 72 male brown Norway (BN) rats and then were randomized into the CEL-PLGA-MS group, celecoxib group, blank PLGA group and PBS group. CEL-PLGA-MS with 320  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib, 80  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib, blank PLGA microspheres solution and 0.01 mol/L PBS was intravitreally injected separately according to the grouping. CNV was assessed by fundus fluorescein angiography (FFA) on the 14th day after injection. The fibrovascular proliferation (FVP) thickness at photocoagulation spots was measured by OCT. The retinal pigment epithelium (RPE)-choroid-sclera sections were prepared for the histopathological examination of FVP. On the 7th and 28th day after intravitreal injection, the relative expression levels of VEGF mRNA and COX-2 mRNA in the photocoagulation area were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR). The use and feeding of the experimental animals were followed by the ARVO statement. **Results** CEL-PLGA-MS showed the spherical shape with the mean size of 2 467.9 nm and the drug-loading of 7.77% and the drug-release rate of 80.91% *in vitro* for 45 days. It presented the controllable release characteristics. CEL-PLGA-MS agglomerated in vitreous body after injection. On the 14th day after intravitreal injection, the mean FVP thicknesses were (94.67 $\pm$ 4.64), (98.56 $\pm$ 4.72), (71.00 $\pm$ 4.77), (50.44 $\pm$ 3.01)  $\mu\text{m}$  in the blank PLGA microspheres group, PBS group, celecoxib group and CEL-PLGA-MS group, respectively, showing significant increases in mean FVP thickness in the blank PLGA microspheres group and PBS group compared with the celecoxib group and CEL-PLGA-MS group (all at  $P < 0.01$ ), and the CEL-PLGA-MS group appeared a lower mean FVP thickness value than the celecoxib group ( $P < 0.01$ ). FFA revealed a large number of strong hyperfluorescences at the photocoagulation area in the rat eyes of the blank PLGA microspheres group and PBS group; while only weak hyperfluorescences were seen in the celecoxib group and CEL-PLGA-MS group. Histopathological examinations verified the same results in the FVP thickness to OCT image. The relative expression levels of COX-2 mRNA and VEGF mRNA in the RPE-choroid-sclera were all significantly elevated in the blank PLGA microspheres group compared with the celecoxib group and CEL-PLGA-MS group both on the 7th and 28th day after intravitreal injection (all at  $P < 0.01$ ). On the 7th day after injection, the relative expression levels of COX-2 mRNA were lower on the 7th day and the relative expression levels of COX-2 mRNA and VEGF mRNA were higher on the 28th day in the celecoxib group in comparison with the CEL-PLGA-MS group (all at  $P < 0.01$ ). **Conclusions** CEL-PLGA-MSs are even in size with the spherical shape and controllable release characteristics *in vitro*. CEL-PLGA-MS can inhibit experimental CNV and was more durable effective than celecoxib after intravitreal injection.

**[Key words]** Celecoxib; Poly lactide-co-glycolide; Sustained-release microparticles; Choroidal neovascularization

**Fund program:** Medical Science Research Key Project in Hebei Province (20120069)

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是来自脉络膜血管的增生性改变, 其病理过程为异常生长的脉络膜毛细血管突破 Bruch 膜, 增生并穿透视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 层至视网膜神经上皮层下, 易出血机化形成瘢痕组织, 影响视功能。目前, 临床上治疗 CNV 的方法包括药物、激光和手术, 但存在着复发率高、费用高、效果不明显等缺点。近年来的研究表明, 选择性环氧合酶 2

(cyclooxygenase-2, COX-2) 抑制剂塞来昔布能够抑制实验性 CNV<sup>[1-3]</sup>, 但 CNV 的发生和发展是一个缓慢的动态过程, 血液中的游离药物无法长时间在病灶区维持有效的药物浓度。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (poly lactide-glycolide acid, PLGA) 是一种合成的生物可降解高分子物质, 已广泛用于缓控释系统的骨架材料, 但尚未用于塞来昔布-PLGA 微球的制备和应用。本研究中制备新的药物剂型塞来昔布-PLGA 微球 (celecoxib

PLGA microsphere, CEL-PLGA-MS), 并进一步评价 CEL-PLGA-MS 的缓释特性及其抑制实验性 CNV 的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 72 只清洁级健康雄性棕色挪威 (brown Norway, BN) 大鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司提供), 体质量 200 ~ 250 g, 双眼经裂隙灯显微镜、间接检眼镜检查正常。实验动物的使用及饲养均遵循 ARVO 声明。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 塞来昔布 (纯度为 99.80%, 武汉远启医药化工有限公司); PLGA (相对分子质量为 15 000, 山东省医疗器械研究所); CEL-PLGA-MS、空白 PLGA 微球 (河北医科大学药剂教研室自制); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司)。粒度分析仪 (美国 Brookhaven 公司); S-3500N 扫描电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); Lab Alliance model 500 高效液相色谱仪 (美国 ASI 公司); OCT 仪、眼底血管造影仪 (德国 Heidelberg 公司); 切片仪 (德国 Leica 公司); 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 7300 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 5417R 型冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 CEL-PLGA-MS 的形态学观察及粒径测定** 采用扫描电子显微镜观察 CEL-PLGA-MS 的形态, 用粒度分析仪测量其粒径。

**1.2.2 CEL-PLGA-MS 载药量的测定** (1) 塞来昔布储备液: 精确称量 50 mg 塞来昔布置于 50 ml 量瓶中, 用三氯甲烷和甲醇按体积比 1:49 进行溶解并定容, 质量浓度为 1 mg/ml。(2) 塞来昔布对照液: 取质量浓度为 1 mg/ml 塞来昔布储备液 0.2 ml, 置于 5 ml 量瓶中, 用甲醇定容, 质量浓度为 40  $\mu$ g/ml。(3) 测载药量供试溶液: 精确称量 CEL-PLGA-MS 20 mg, 置于 50 ml 量瓶中, 用三氯甲烷和甲醇按 1:49 的容积比溶解并定容, 待测。分别取质量浓度为 40  $\mu$ g/ml 塞来昔布对照液 2 ml 及测载药量的供试溶液 2 ml, 用孔径 0.22  $\mu$ m 的一次性过滤器过滤, 注入进样瓶中, 用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 重复检测 3 次, 取平均值, 计算载药量。载药量 = 微球中含药量 / 微球总量  $\times$  100%。

**1.2.3 动态膜透析法检测 CEL-PLGA-MS 的体外释放** 精确称取 CEL-PLGA-MS 40 mg, 置于透析袋内, 加入 5 ml pH 7.4 PBS 溶液 (含质量分数 0.5% Tween-20),

扎紧两端后将透析袋置于 100 ml PBS 释放介质 (含质量分数 0.02% 叠氮钠和 0.5% Tween-20) 的具塞三角瓶中, 在 (37.0  $\pm$  0.5)  $^{\circ}$ C 空气恒温摇床上以 100 r/min 速度振荡, 分别于 1、3、5、7、10、15、20、25、30、40、45 d 定时从袋外释放介质中取出 2 ml, 同时立即补加等量新鲜介质, 采用 HPLC 进行检测。

**1.2.4 玻璃体腔注射药物的配制及消毒** 配制 0.01 mol/L PBS (含质量分数 0.5% Tween-20), 高温高压灭菌后备用; 原料药塞来昔布用 PBS 配制成浓度为 80  $\mu$ mol/L 的溶液, 用一次性滤器无菌过滤后密封于无菌小瓶中备用; CEL-PLGA-MS 及等量空白 PLGA 微球经  $\gamma$  射线消毒后分别用 PBS 配制成溶液, 其中 CEL-PLGA-MS 中含塞来昔布 320  $\mu$ mol/L, 密封于无菌小瓶中备用。

**1.2.5 动物模型的建立及分组** 大鼠腹腔内注射质量分数 10% 水合氯醛溶液 (3.5 ml/kg) 行全身麻醉, 复方托吡卡胺滴眼液扩瞳, 医用透明质酸钠凝胶点眼, 眼前放置盖玻片, 裂隙灯显微镜下用 647 nm 氦激光于距离视盘 1.5 ~ 2.0 视盘直径 (disc diameter, DD) 处等距离光凝 8 ~ 10 个点, 功率为 150 mW, 光斑直径为 50  $\mu$ m, 曝光时间为 50 ms。光凝后局部视网膜有气泡产生或伴有轻度出血 (有时伴有轻响) 者为击破 Bruch 膜的标志, 记为有效光凝点。按随机数字表法将大鼠分为 4 个组, CEL-PLGA-MS 组 18 只大鼠右眼玻璃体腔注入 CEL-PLGA-MS 320  $\mu$ mol/L; 塞来昔布组 18 只大鼠右眼玻璃体腔注入塞来昔布 80  $\mu$ mol/L; 空白 PLGA 组 18 只大鼠, 右眼玻璃体腔注入空白 PLGA 微球; PBS 组 18 只大鼠右眼玻璃体腔注入 0.01 mol/L PBS。

**1.2.6 药物的玻璃体腔注射** 将 BN 大鼠用 10% 水合氯醛 (0.35 ml/100 g) 腹腔内注射麻醉, 然后将其固定于操作台, 模型眼用质量分数 0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液点眼行表面麻醉, 手术显微镜直视下用 1 ml 注射器针头在角膜缘后 0.5 mm 处穿刺 (靠近大鼠耳侧偏上方), 然后用 50  $\mu$ l 微量注射器根据 1.2.5 分组信息抽取已配制的相应药物溶液 8  $\mu$ l 沿穿刺口处朝向视盘方向注入玻璃体腔, 此时可见眼球轻度膨大, 术毕局部涂氧氟沙星眼膏。

**1.2.7 OCT 和荧光素眼底血管造影检查** 玻璃体腔注射药后 14 d 大鼠麻醉及扩瞳方法同 1.2.5, 模型眼行 OCT 检查, 测量各组大鼠纤维血管增生 (fibrovascular proliferation, FVP) 厚度, 然后大鼠腹腔内注射质量分数 10% 荧光素钠注射液 0.5 ml/kg 行荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA) 检查, 观察

各组大鼠 CNV 的形成情况。

**1.2.8 视网膜组织病理学检查** 大鼠行 FFA 后 6 h, 待荧光素大部分从大鼠体内代谢, 分别取各组中 4 只大鼠, 腹腔内注射过量水合氯醛法处死, 立即摘取模型眼眼球, 置于甲醛-冰醋酸-乙醇混合固定液中, 固定 48~72 h, 经梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 修整蜡块, 标本矢状位 4  $\mu\text{m}$  厚连续切片, 低倍镜下反复观察对比, 选取明确血管化的激光斑连续切片中的最大 FVP 膜切片(即 FVP 膜逐渐增大然后又逐渐减小的拐点处的数张切片)进行烤片, 组织切片脱蜡, 常规苏木精-伊红染色, 封片, 光学显微镜下观察。

**1.2.9 RT-PCR 法测定 RPE-脉络膜-巩膜标本中 COX-2 mRNA 和血管内皮生长因子 mRNA 的表达**

(1) 标本制作 分别于玻璃体腔注射后 7 d 和 28 d, 每个时间点各组分别取 BN 大鼠 7 只实验眼, 剪开角膜, 去除眼前节及玻璃体, 小心制作 RPE-脉络膜-巩膜标本, 迅速放入液氮中, 然后转到  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。(2) 总 RNA 的提取 取约 10 mg 组织于 1.5 ml 冰浴离心管中, 加入 1 ml Trizol 液, 用匀浆器迅速将其研磨成匀浆。加入 200  $\mu\text{l}$  氯仿, 剧烈振荡 30 s, 于冰上静置 5 min。4  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 离心半径 10 cm, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上层水相 500  $\mu\text{l}$  移至另一 1.5 ml 离心管中, 加入等容积异丙醇, 颠倒混匀, 室温静置 10 min。4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入体积分数 75% 乙醇 1 ml, 轻轻混匀。4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 7 500 r/min 离心 5 min, 吸净上清液, 于室温下晾干, 加入 25  $\mu\text{l}$  DEPC 处理的去离子水溶解及沉淀,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。(3) RNA 的纯度及完整性检测 取 RNA 溶液 5  $\mu\text{l}$ , 经质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 明显可见 28S、18S 条带, 且 28S 为 18S 条带灰度值的 2 倍, 5S 条带较暗且弥散, 表明 RNA 降解较少, 完整性较好。用 756 型紫外分光光度计测定波长为 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(A),  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8~2.0, 表明所提取的 RNA 蛋白污染少, 纯度较高, 可用于后续的逆转录反应。(4) 逆转录反应 逆转录反应体系总体积为 20  $\mu\text{l}$ , 包括 2 倍 ES 10  $\mu\text{l}$ , ES 1  $\mu\text{l}$ , 随机引物 1  $\mu\text{l}$ , RNA 模板 8  $\mu\text{l}$ 。逆转录反应条件: 25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  孵育 50 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min。逆转录完成后用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 20 倍,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。(5) SYBR Green 荧光定量 PCR 检测引物序列: COX-2 上游引物: 5'-TTCAACCAGCAGTTCCAGTATC-3', 下游引物: 5'-ACAAAGTGAGCAAGTCCGTG-3'; 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 上游引物: 5'-ATCTTCAAGCCGTCCTGTG-3', 下游引物: 5'-CATCTCTCCTA

TGTGCTGGC-3'; GAPDH 上游引物: 5'-TGAACGGG AAGCTCACTG-3', 下游引物: 5'-GCTTCACCACC TTCTTGATGTC-3'。PCR 反应体系总体积为 20  $\mu\text{l}$ , 包括逆转录产物 8  $\mu\text{l}$ , 2 倍 Master Mix 10  $\mu\text{l}$ , 上下游引物各 1  $\mu\text{l}$ 。95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 27 s, 进行 40 个循环。在每个循环延伸步骤收集荧光信号, 以 GAPDH 作为内参照, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{CT}$</sup>  法分析目的基因的相对表达量 (related quantitation, RQ)。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件 (美国 SPSS 公司) 进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapira-Wilk 检验呈正态分布, 以  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间均数经 Levene 检验方差齐。采用完全随机分组 4 水平实验设计, CEL-PLGA-MS 组、塞来昔布组、空白 PLGA 组和 PBS 组间大鼠平均 FVP 厚度值的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK-*q* 检验。各组大鼠在玻璃体腔注射后 7 d、28 d RPE-脉络膜-巩膜标本中 COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA 的 RQ 值总体差异比较采用析因设计两因素方差分析, 多重比较采用 SNK-*q* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CEL-PLGA-MS 的形态及粒径

扫描电子显微镜下 CEL-PLGA-MS 呈球形, 大小均匀, 表面光滑, 分散性好 (图 1)。粒度分析仪测量其粒径为 2 436.6~2 515.0 nm, 平均 2 467.9 nm。



图 1 扫描电子显微镜下 CEL-PLGA-MS 的形态 ( $\times 1\ 500$ ) CEL-PLGA-MS 呈球形, 大小均匀, 表面光滑, 分散性好

### 2.2 CEL-PLGA-MS 的载药量及体外释放

HPLC 测定 3 次塞来昔布对照液的平均峰面积为 3 093 762, 3 批 CEL-PLGA-MS 供试液的峰面积分别为 2 430 772、2 376 105 和 2 403 440, 载药量分别为 7.86%、7.68% 和 7.77%。CEL-PLGA-MS 载药量稳定, 平均载药量为 7.77%, 体外释放 45 d, 累积释放百分率为 80.91%, 缓释作用明显 (图 2, 3)。运用常用

的零级释药模型、一级释药模型、Higuchi 模型对微球的累积释放数据进行拟合,符合 Higuchi 模型,方程为  $Y=12.756X^{1/2}+2.1665$ ,  $r=0.9572$ ,其中  $Y$  为释放度,  $X$  为释放时间。

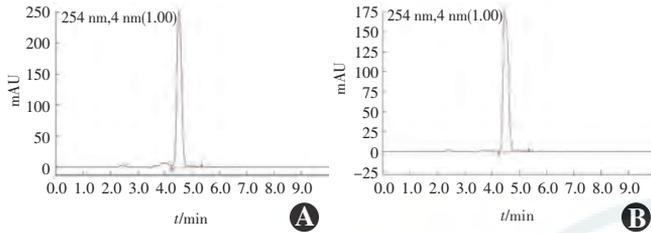


图 2 塞来昔布的 HPLC 色谱图 A: 质量浓度 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  塞来昔布对照液 B: CEL-PLGA-MS 供试溶液

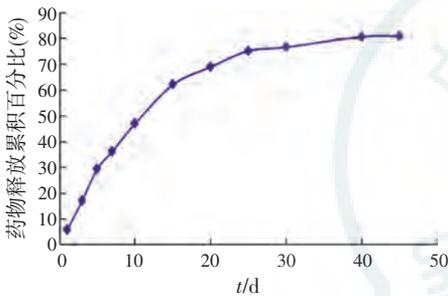


图 3 CEL-PLGA-MS 中塞来昔布的体外释放曲线 体外释放 45 d, 药物累积释放百分率为 80.91%, 缓释作用明显

**2.3 各组大鼠实验眼 OCT 视网膜脉络膜厚度的改变**  
玻璃体腔注射后 14 d, 距视盘 1.5 ~ 2.0 DD 视网膜层间可见梭形高反射区, 即为 FVP 膜(图 4), 各组之间大鼠平均 FVP 厚度值差异有统计学意义 ( $F=239.32, P<0.01$ ), 其中空白 PLGA 组和 PBS 组间大鼠平均 FVP 厚度值的差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 但明显高于塞来昔布组和 CEL-PLGA-MS 组, 差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ ), CEL-PLGA-MS 组大鼠平均 FVP 厚度值低于塞来昔布组, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )(表 1)。

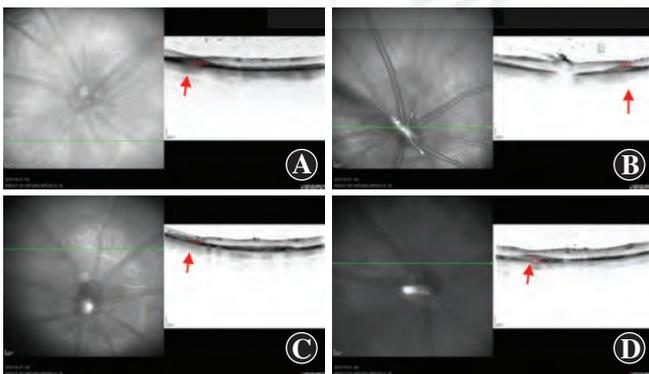


图 4 各组大鼠视网膜 OCT 图像 A: PBS 组中 BN 大鼠 FVP 膜厚度为 106  $\mu\text{m}$ (箭头) B: 空白 PLGA 组中 BN 大鼠 FVP 膜厚度为 88  $\mu\text{m}$ (箭头) C: CEL-PLGA-MS 组中 BN 大鼠 FVP 膜厚度为 51  $\mu\text{m}$ (箭头) D: 塞来昔布组中 BN 大鼠 FVP 膜厚度为 72  $\mu\text{m}$ (箭头)

表 1 各组大鼠视网膜平均 FVP 厚度值比较( $\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$ )

组别	眼数	厚度值
空白 PLGA 组	4	94.67 $\pm$ 4.64
PBS 组	4	98.56 $\pm$ 4.72
塞来昔布组	4	71.00 $\pm$ 4.77 <sup>ab</sup>
CEL-PLGA-MS 组	4	50.44 $\pm$ 3.01 <sup>abc</sup>
<i>F</i>		239.32
<i>P</i>		<0.01

注: 与空白 PLGA 组比较, <sup>a</sup> $P<0.01$ ; 与 PBS 组比较, <sup>b</sup> $P<0.01$ ; 与塞来昔布组比较, <sup>c</sup> $P<0.01$ (单因素方差分析, SNK- $q$  检验) FVP: 纤维血管增生; PLGA: 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; CEL-PLGA-MS: 塞来昔布-PLGA 微球

**2.4 各组大鼠视网膜 FFA 表现**

FFA 晚期, 空白 PLGA 组和 PBS 组大鼠实验眼视网膜光凝斑处出现明显的荧光素渗漏, 呈高荧光, 而塞来昔布组和 CEL-PLGA-MS 组大鼠实验眼视网膜光凝斑荧光素渗漏较少, FFA 后期可见轻度强荧光, 但荧光强度明显弱于空白 PLGA 组和 PBS 组(图 5)。

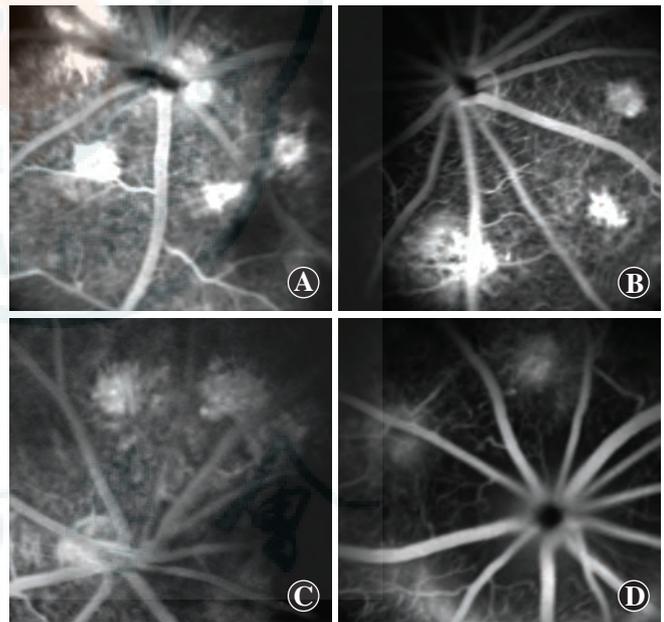


图 5 各组大鼠视网膜 FFA 图像 A: 空白 PLGA 组视网膜光凝斑荧光素渗漏明显, 呈强荧光 B: PBS 组视网膜光凝斑荧光素渗漏明显, 呈强的高荧光 C: 塞来昔布组视网膜光凝斑荧光素部分渗漏, 呈弱荧光 D: CEL-PLGA-MS 组视网膜光凝斑荧光素部分渗漏, 呈弱荧光

**2.5 各组大鼠实验眼的视网膜组织病理学表现**

光学显微镜下可见激光光凝处内层视网膜凹陷, 部分区域内核层、外核层消失, 视网膜各层结构排列紊乱, 光感受器层消失, RPE 层和 Bruch 膜破裂, 色素脱失或大量增生, FVP 膜中可见 RPE 细胞、成纤维细胞和巨噬细胞及新生毛细血管管腔内的红细胞。空白

PLGA 组和 PBS 组大鼠视网膜光凝区中纤维血管较塞来昔布组和 CEL-PLGA-MS 组明显增多。空白 PLGA 组和 PBS 组大鼠实验眼 FVP 较塞来昔布组和 CEL-PLGA-MS 组明显增厚(图 6)。

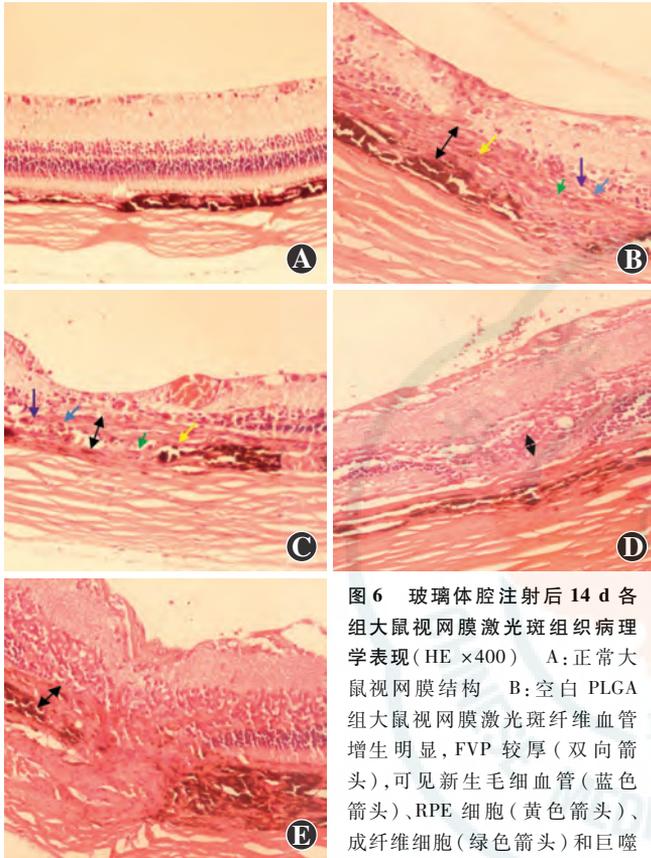


图 6 玻璃体腔注射后 14 d 各组大鼠视网膜激光斑组织病理学表现(HE ×400) A: 正常大鼠视网膜结构 B: 空白 PLGA 组大鼠视网膜激光斑纤维血管增生明显, FVP 较厚(双向箭头), 可见新生毛细血管(蓝色箭头)、RPE 细胞(黄色箭头)、成纤维细胞(绿色箭头)和巨噬细胞(紫色箭头) C: PBS 组大鼠视网膜激光斑纤维血管增生明显, FVP 较厚(双向箭头), 可见新生毛细血管(蓝色箭头)、RPE 细胞(黄色箭头)、成纤维细胞(绿色箭头)和巨噬细胞(紫色箭头) D: CEL-PLGA-MS 组大鼠激光斑纤维血管增生程度较低, FVP 厚度较空白 PLGA 组和 PBS 组薄(双向箭头) E: 塞来昔布组大鼠激光斑 FVP 亦薄于空白 PLGA 组和 PBS 组(双向箭头)

大鼠视网膜激光斑纤维血管增生明显, FVP 较厚(双向箭头), 可见新生毛细血管(蓝色箭头)、RPE 细胞(黄色箭头)、成纤维细胞(绿色箭头)和巨噬细胞(紫色箭头) D: CEL-PLGA-MS 组大鼠激光斑纤维血管增生程度较低, FVP 厚度较空白 PLGA 组和 PBS 组薄(双向箭头) E: 塞来昔布组大鼠激光斑 FVP 亦薄于空白 PLGA 组和 PBS 组(双向箭头)

### 2.6 COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA 在各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜标本中的表达

4 个组大鼠在不同检测时间点 COX-2 mRNA RQ 值总体差异比较均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 100.37, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 65.83, P < 0.01$ ), 并且药物和时间两因素间存在交互作用 ( $F_{\text{交互作用}} = 26.29, P < 0.01$ )。玻璃体腔注射后 7 d, CEL-PLGA-MS 组和塞来昔布组大鼠 COX-2 mRNA RQ 值明显低于空白 PLGA 组和 PBS 组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ), 塞来昔布组大鼠 COX-2 mRNA RQ 值明显低于 CEL-PLGA-MS 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 玻璃体腔注射后 28 d, 塞来昔布组 COX-2 mRNA RQ 值明显高于 CEL-PLGA-MS 组, 低于空白 PLGA 组, 差异均有统计学意义(均

$P < 0.01$ ), 但与 PBS 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。4 个组间大鼠 VEGF mRNA RQ 值总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 62.32, P < 0.01$ ), 不同时间点大鼠 VEGF mRNA RQ 值的总体差异无统计学意义 ( $F_{\text{时间}} = 3.20, P > 0.05$ ), 并且药物和时间两因素存在交互作用 ( $F_{\text{交互作用}} = 9.95, P < 0.01$ )。玻璃体腔注射后 7 d, 塞来昔布组与 CEL-PLGA-MS 组 VEGF mRNA RQ 值比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但其 RQ 值明显低于空白 PLGA 组和 PBS 组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ), 玻璃体腔注射后 28 d, 塞来昔布组 VEGF mRNA RQ 值明显高于 CEL-PLGA-MS 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (表 2, 3)。

表 2 各组大鼠玻璃体腔注射后不同时间点 RPE-脉络膜-巩膜中 COX-2 mRNA 表达的 RQ 值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	不同时间点 COX-2 mRNA 的 RQ 值	
		注射后 7 d	注射后 28 d
空白 PLGA 组	7	1.68 ± 0.09	1.91 ± 0.15
PBS 组	7	1.58 ± 0.34	1.75 ± 0.13
塞来昔布组	7	0.41 ± 0.18 <sup>ab</sup>	1.58 ± 0.26 <sup>a</sup>
CEL-PLGA-MS 组	7	0.74 ± 0.10 <sup>abc</sup>	0.79 ± 0.09 <sup>abc</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 100.37, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 65.83, P < 0.01; F_{\text{交互作用}} = 26.29, P < 0.01$ 。与各自的空白 PLGA 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与各自的 PBS 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与各自的塞来昔布组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$  (析因设计两因素方差分析, SNK-q 检验) RPE: 视网膜色素上皮; COX: 环氧化酶; RQ: 相对表达量; PLGA: 聚乳酸-羟基醋酸共聚物; CEL-PLGA-MS: 塞来昔布-聚乳酸-羟基醋酸共聚物微球

表 3 各组大鼠玻璃体腔注射后不同时间点 RPE-脉络膜-巩膜中 VEGF mRNA 的 RQ 值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	不同时间点 VEGF-mRNA 的 RQ 值	
		注射后 7 d	注射后 28 d
空白 PLGA 组	7	1.95 ± 0.30	2.18 ± 0.30
PBS 组	7	2.01 ± 0.52	2.04 ± 0.11
塞来昔布组	7	0.71 ± 0.25 <sup>ab</sup>	1.53 ± 0.44 <sup>ab</sup>
CEL-PLGA-MS 组	7	0.94 ± 0.20 <sup>ab</sup>	0.46 ± 0.20 <sup>abc</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 62.32, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 3.20, P > 0.05; F_{\text{交互作用}} = 9.95, P < 0.01$ 。与各自的空白 PLGA 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与各自的 PBS 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与各自的塞来昔布组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$  (析因设计两因素方差分析, SNK-q 检验) RPE: 视网膜色素上皮; VEGF: 血管内皮生长因子; RQ: 相对表达量; PLGA: 聚乳酸-羟基醋酸共聚物; CEL-PLGA-MS: 塞来昔布-聚乳酸-羟基醋酸共聚物微球

### 3 讨论

由于血-眼屏障的存在, 全身给药和眼外局部给药治疗 CNV 均很难在眼内达到有效药物浓度, 或因用药的剂量大而导致全身毒性作用和不良反应的发生。玻璃体腔给药是最有效的给药途径, 但有白内障、眼内

炎和视网膜脱离的风险,且因药物半衰期短,玻璃体腔给药常需反复多次注射。因此,寻找安全、有效、药效持久的玻璃体腔给药方法是临床研究热点。

PLGA 是一种生物可降解的合成高分子材料,具有质量稳定、生物相容性好、生物降解速度可控且降解产物毒性低和良好的可塑性等优点,广泛用作缓控释系统的骨架材料<sup>[4-5]</sup>。本研究中采用 PLGA 作为载体,制备了 CEL-PLGA-MS,并观察其形态、粒径、载药量、体外释放情况,结果证明 CEL-PLGA-MS 与原料药塞来昔布相比具有明显的缓释效果。

杨秀梅等<sup>[6]</sup>研究证明,BN 大鼠视网膜光凝后 3 d 光斑处会有内皮细胞增生,CNV 于 7 d 开始形成,14 d 达高峰,因此本研究中选择造模注药后 14 d 评价各组 CNV 生成情况、厚度及病理结构的变化。大多数研究通过计算光凝区 CNV 生成率或测量病理连续切片中 FVP 厚度的方法评价 CNV 生成情况<sup>[7-9]</sup>。由于以上方法主观性强,不能完全客观地评价 CNV 的变化,因此本研究中采用 FFA 和病理切片的方法从形态学上评价各组 CNV 生成情况和病理结构的不同,用 OCT 测量 FVP 厚度值,从而客观量化评价 CNV 厚度的不同,结果显示 OCT 测量 CEL-PLGA-MS 组和塞来昔布组 FVP 平均厚度低于空白 PLGA 组和 PBS 组。FFA 晚期图像显示塞来昔布组和 CEL-PLGA-MS 组视网膜光凝斑荧光素渗漏得到抑制。组织病理学观察显示,视网膜光凝区中空白 PLGA 组和 PBS 组 FVP 程度明显高于塞来昔布组和 CEL-PLGA-MS 组。以上结果充分说明玻璃体腔注射 CEL-PLGA-MS 或塞来昔布能够有效抑制 CNV 生成。

以往研究表明,VEGF mRNA 和 COX-2 mRNA 在 CNV 造模后 7 d 均能有效表达<sup>[10-11]</sup>,考虑到塞来昔布和塞来昔布-PLGA 缓释微球在玻璃体腔中代谢的时效性,本研究中选择在造模注药后 7 d、28 d,通过 RT-PCR 法测定各组 VEGF mRNA 和 COX-2 mRNA 表达的不同,以进一步评价其在抑制 CNV 方面的效果。

RT-PCR 测定结果显示,造模注药后 7 d,CEL-PLGA-MS 组和塞来昔布组均能抑制 COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA 的表达,至造模注药后 28 d,CEL-PLGA-MS 组仍能够抑制 COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA 的表达,塞来昔布组仅能部分抑制 VEGF mRNA 的表达,未能抑制 COX-2 mRNA 的表达。说明原料药塞来昔布在玻璃体腔中 28 d 已经部分代谢,不能达到有效浓度,而 CEL-PLGA-MS 仍能维持有效浓度,抑制 CNV 的生成。

本实验结果表明,CEL-PLGA-MS 能够抑制实验性 CNV 形成,并且比塞来昔布作用时间更持久。玻璃体

腔注射 CEL-PLGA-MS 有望成为一种理想的防治 CNV 的新方法。本研究的不足之处是 CEL-PLGA-MS 组和塞来昔布组中塞来昔布净含量不同,若 2 个组剂量相同,由于 CEL-PLGA-MS 药物释放缓慢,疗效将不明确。有关 CEL-PLGA-MS 中塞来昔布的适宜含量尚待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 郝玉华,李瑾,赵欣.塞来昔布对实验性脉络膜新生血管的抑制作用[J].中华眼底病杂志,2010,26(1):32-36. DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2010.01.09.
- [2] 郝玉华,李瑾,赵欣.塞来昔布对实验性脉络膜新生血管的抑制作用[J].中华眼底病杂志,2010,26(1):32-36. DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2010.01.09.
- [3] 蔡岩,王雨生,徐建锋,等.玻璃体内注射塞来昔布对激光诱导大鼠脉络膜新生血管的抑制作用[J].眼科研究,2009,27(11):945-949. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2009.11.001.
- [4] 蔡岩,王雨生,徐建锋,等.玻璃体内注射塞来昔布对激光诱导大鼠脉络膜新生血管的抑制作用[J].眼科研究,2009,27(11):945-949. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2009.11.001.
- [5] 蔡岩,王雨生,徐建锋,等.玻璃体内注射塞来昔布对激光诱导大鼠脉络膜新生血管的抑制作用[J].眼科研究,2009,27(11):945-949. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2009.11.001.
- [6] 杨秀梅,王雨生,徐建峰,等.激光诱导有色大鼠脉络膜新生血管的形态学观察[J].眼科新进展,2006,26(3):161-166.
- [7] 杨秀梅,王雨生,徐建峰,等.激光诱导有色大鼠脉络膜新生血管的形态学观察[J].眼科新进展,2006,26(3):161-166.
- [8] 杨秀梅,王雨生,徐建峰,等.激光诱导有色大鼠脉络膜新生血管的形态学观察[J].眼科新进展,2006,26(3):161-166.
- [9] 杨秀梅,王雨生,徐建峰,等.激光诱导有色大鼠脉络膜新生血管的形态学观察[J].眼科新进展,2006,26(3):161-166.
- [10] 杨秀梅,王雨生,徐建峰,等.激光诱导有色大鼠脉络膜新生血管的形态学观察[J].眼科新进展,2006,26(3):161-166.
- [11] 杨秀梅,王雨生,徐建峰,等.激光诱导有色大鼠脉络膜新生血管的形态学观察[J].眼科新进展,2006,26(3):161-166.

(收稿日期:2015-08-17)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)