

· 实验研究 ·

贝伐单抗结膜下注射对青光眼滤过术后滤过泡瘢痕化的抑制作用

梁沛 杨瑾 林锦镛

300020 天津医科大学眼科临床学院 天津市眼科医院 天津市眼科学与视觉科学重点实验室 天津市眼科研究所

通信作者:杨瑾, Email: yangjin979@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.07.004

【摘要】 **背景** 青光眼滤过手术术后滤过道的瘢痕化是导致手术失败的主要原因。传统的抑制滤过道瘢痕化的方法是丝裂霉素 C 的应用,但存在较多的并发症。研究表明贝伐单抗具有抑制新生血管和纤维增生的作用,其对青光眼滤过术后滤过泡瘢痕化是否有抑制作用受到关注。**目的** 观察贝伐单抗结膜下注射对兔眼小梁切除术后滤过泡纤维瘢痕形成的抑制效果。**方法** 按随机数字表法将 7~9 周龄新西兰大白兔 40 只随机分为 4 个组,各组兔右眼均行常规小梁网切除术。贝伐单抗单次注射组兔眼术毕结膜下注射贝伐单抗 0.05 ml (25 mg/ml),贝伐单抗多次注射组兔眼分别于术毕及术后 3、7 d 注射贝伐单抗,每次均注射 0.05 ml,丝裂霉素 C 组兔眼术毕局部涂用丝裂霉素 C,生理盐水组兔眼术毕以同样的方法注射 0.05 ml 生理盐水。所有兔眼术后每隔 1 日用 Schiötz 眼压计测量眼压,行裂隙灯显微镜检查以观察滤过泡形态及其表面的血管分布,并用卡尺测量和计算滤过泡面积。分别于术后 14 d 和 28 d 摘取实验眼行滤过泡组织病理学检查,采用免疫组织化学法检测滤过道组织中血管内皮细胞标志物 CD31 的表达以计算微血管数目。**结果** 各组兔眼术后眼压值的总体比较差异无统计学意义 ($F=0.88, P=0.47$)。与贝伐单抗单次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组兔眼滤过泡的形态比较,术后 7 d 贝伐单抗多次注射组兔眼滤过泡高度隆起且弥散,表面血管稀疏。贝伐单抗多次注射组兔眼滤过泡生存时间为 27 d,而贝伐单抗单次注射组、丝裂霉素 C 组均为 19 d,生理盐水组为 13 d。术后 14 d 各组兔眼滤过道胶原纤维百分比分别为 $(49.18 \pm 1.54)\%$ 、 $(26.41 \pm 1.23)\%$ 、 $(50.68 \pm 1.87)\%$ 和 $(70.63 \pm 1.81)\%$,贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组、丝裂霉素 C 组滤过道胶原纤维百分比均低于生理盐水组,贝伐单抗多次注射组低于贝伐单抗单次注射组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后 28 d 贝伐单抗多次注射组胶原纤维百分比为 $(66.82 \pm 1.53)\%$,其他 3 个组出现瘢痕化。术后 14 d 贝伐单抗多次注射组兔眼滤过道组织中微血管数目明显低于贝伐单抗单次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。术后 28 d 贝伐单抗多次注射组兔眼滤过道组织中微血管数目为 3.51 ± 0.31 ,均高于贝伐单抗注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** 青光眼滤过术后结膜下注射贝伐单抗有助于维持功能滤过泡的形态,抑制滤过道瘢痕化,提高手术的成功率。

【关键词】 人源化单克隆抗体; 贝伐单抗; 结膜/病理; 动物模型; 纤维化/预防 & 控制; 青光眼/手术; 小梁切除术; 伤口愈合/药物作用

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (13JCYBJC21500)

Inhibitory effects of bevacizumab on filtering bleb scarring following trabeculectomy in rabbits Liang Pei, Yang Jin, Lin Jinyong

Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin Eye Hospital, Tianjin Key Lab of Ophthalmology and Visual Science, Tianjin Eye Institute, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Yang Jin, Email: yangjin979@163.com

【Abstract】 **Background** The primary reason to trabeculectomy failure is fibrosis of conjunctiva and episclera because of progressive fibroblast proliferation and collagen deposition of the filtration bleb. Conventional methods of inhibiting bleb scarring was intraoperative application of mitomycin C (MMC), but many complications occurred after surgery. Researches showed that bevacizumab was an antifibrotic agent, and whether it can suppress scarring of filtering bleb after trabeculectomy is concerned. **Objective** The aim of this study was to evaluate the antifibrotic efficacy of bevacizumab after trabeculectomy in rabbits. **Methods** Forty New Zealand rabbits were

randomly divided into four groups. Trabeculectomy was performed on the right eyes of each rabbits. The rabbits received subconjunctival injection of 0.05 ml bevacizumab (25 mg/ml) at the end of operation in the bevacizumab single injection group. The same dose of bevacizumab was respectively injected at the end of operation as well as 3 days and 7 days after operation in the bevacizumab repetition injection group, and 0.05 ml normal saline solution was used in the same way in the normal saline group. In the MMC group, MMC cotton patch with 0.2 mg/ml was placed under the Tenon capsula and scleral flap for 3 minutes during operation. The intraocular pressure (IOP), bleb area and shape were evaluated during the 28-day period. The animals were sacrificed on postoperative day 14 and 28, respectively for the histopathologic examination of bleb. The expression of CD31 in the bleb was detected by immunohistochemistry for the calculation of microvessels. All experiments were performed in accordance with the ethics code for animal experimentation and approved by the Institutional Review Board of Tianjin Eye Hospital.

Results No significant difference was found in the postoperative IOP among the groups ($F = 0.88, P = 0.47$). Compared with the bevacizumab single injection group, MMC group and normal saline group, the shape of bleb was higher and much diffuse with sparse vessels 7 days after operation in the bevacizumab repetition injection group. The survival time of bleb was 27 days, 19 days and 13 days in the bevacizumab repetition injection group, the bevacizumab single injection group, MMC group and normal saline group, respectively. The percentage of collagen deposition area was $(49.18 \pm 1.54)\%$, $(26.41 \pm 1.23)\%$, $(50.68 \pm 1.87)\%$ and $(70.63 \pm 1.81)\%$ at day 14 postoperative in the bevacizumab single injection group, bevacizumab repetition injection group, MMC group and normal saline group, respectively, with the largest area in the normal saline group, and percentage of collagen deposition area was significantly reduced in the bevacizumab repetition injection group compared with the bevacizumab single injection group (all at $P < 0.05$). The percentage of collagen deposition area was $(66.82 \pm 1.53)\%$ at day 28 postoperative in the bevacizumab repetition injection group, while complete scarring was seen in other 3 groups. The number of microvessels was least at postoperative day 14 in the bevacizumab repetition injection group compared with the bevacizumab single injection group, MMC group and normal saline group (all at $P < 0.05$). The number of microvessels was more in postoperative day 28 in the bevacizumab repetition injection group (3.51 ± 0.31) compared with other groups (all at $P < 0.05$).

Conclusions Subconjunctival injection of bevacizumab following trabeculectomy can improve the successful rate of surgery by remaining the survival time of filtering bleb, inhibiting the bleb scarring in rabbits.

[Key words] Antibodies, monoclonal, humanized; Bevacizumab; Conjunctiva/pathology; Disease models, animal; Fibrosis/prevention & control; Glaucoma/surgery; Trabeculectomy; Wound healing/drug effects

Fund program: Tianjin Municipal Science and Technology Commission (13JCYBJC21500)

目前滤过手术是治疗青光眼的有效方法,手术疗效取决于滤过泡的形态和功能,术后滤过通道组织的瘢痕化是手术失败的主要原因,而青光眼滤过手术后炎症反应、新生血管形成、成纤维细胞增生和细胞外基质的过度表达均与术后瘢痕形成有关^[1]。研究证实,术中局部应用丝裂霉素 C 和 5-氟尿嘧啶等抗代谢药物可抑制滤过通道的瘢痕化,但有发生术后低眼压、薄壁滤过泡、滤过泡渗漏甚至眼内炎等并发症的风险^[2-3]。近来研究发现,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)具有促进血管内皮细胞增生、增加血管通透性、促进血管支持物生成和促进瘢痕形成的功能^[4-5],但在抗青光眼滤过手术中应用抗 VEGF 药物能否抑制滤过通道瘢痕的形成,从而保持功能性滤过泡的作用有待研究证实。本研究中拟探讨结膜下注射抗 VEGF 药物贝伐单抗(商品名 Avastin)对兔眼滤过手术模型新生血管生成和纤维组织增生的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 7~9 周龄健康新西兰大白兔 40 只(天津医科大学实验动物中心提供),雌雄不限,体质量 2.0~2.5 kg,双眼前节和眼底检查均正常。剔除 Schiötz 眼压计测量的 3 d 内眼压波动 > 5 mmHg ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$)或双眼眼压差值 > 5 mmHg 的新西兰大白兔。每只动物均在具有相同的环境和恒定温度的不锈钢笼子里饲养,自由采食和饮水,所有动物的饲养及处死均按照《实验动物管理及使用指南》执行。

1.1.2 主要试剂及仪器 盐酸赛拉嗪注射液(吉林省华牧公司);贝伐单抗(瑞士 Roche 公司);丝裂霉素 C(日本协和发酵工业株式会社);Masson 三色染色剂(天津市眼科医院病理科提供);CD31 抗体免疫组织化学染色试剂盒(编号:bs-0195R 北京 Bioss 公司)。手术显微镜(德国 Zeiss 公司);Schiötz 眼压计(苏州

医疗器械厂);游标卡尺(哈尔滨 Links 公司);DC-3 型裂隙灯显微镜(日本 Topcon 公司);Ix53 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 青光眼滤过手术及分组 新西兰大白兔按 0.2 ml/kg 的剂量肌内注射盐酸赛拉嗪注射液行全身麻醉,然后行标准小梁切除术。于右眼 12:00 点位做以穹隆为基底的结膜瓣,做以角膜缘为基底、大小为 4 mm×4 mm、厚度为 1/2 ~ 1/3 的巩膜瓣,至透明角膜内 0.5 mm,切除瓣下小梁组织 3 mm×1 mm,并行周边虹膜切除术,10-0 尼龙缝线固定缝合巩膜瓣 2 针,间断缝合结膜瓣切口。术毕术眼涂妥布霉素地塞米松眼膏,用妥布霉素地塞米松滴眼液点眼 28 d,每日 4 次。采用随机数字表不重复抽样法将实验兔随机分为贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组,每组 10 只。贝伐单抗单次注射组术毕时于术区结膜下注射贝伐单抗 0.05 ml,质量浓度为 25 mg/ml;贝伐单抗多次注射组分别于术毕时及术后 3、7 d 在术区结膜下注射贝伐单抗 0.05 ml;丝裂霉素 C 组术中分别于筋膜囊、巩膜瓣下放置质量浓度 0.2 mg/ml 丝裂霉素 C 棉片 3 min,然后以 120 ml 生理盐水冲洗;生理盐水组术毕及术后 3、7 d 术区结膜下注射等容量生理盐水。

1.2.2 眼压测量 实验兔分别于术前及术后 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25 和 27 d 表面麻醉下用 Schiötz 眼压计进行眼压测量,采用双法码校正眼压法,即每眼分别测量 5.5 g 和 10.0 g 砝码下的眼压值或分别测量 7.5 g 和 15.0 g 砝码下的眼压值。同一时间重复测量 3 次,取其平均值。

1.2.3 术眼滤过泡形态的观察及面积的测量 裂隙灯显微镜下观察兔实验眼滤过泡面积及其表面血管的生长情况。术后每隔 1 日局部麻醉下用卡尺测量滤过泡的长度和宽度,计算滤过泡面积。

1.2.4 术眼滤过泡组织病理学检查 分别于术后 14、28 d 每组任意取 5 只兔,耳缘静脉空气栓塞法处死后迅速取出眼球,置于体积分数 10% 甲醛中固定 24 h,然后置于体积分数 70% 和 80% 乙醇中脱水各 12 h,经滤过区矢状面取材,剪取滤过泡区域的结膜、结膜下组织及巩膜组织块,大小约 5 mm×5 mm,按常规组织切片法操作进行逐级乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。行连续切片,厚 5 μm,每隔 3 张取 1 张切片,每个标本取 30 张,采用苏木精-伊红染色在光学显微镜下观察滤过道的组织结构、炎症反应、血管及纤维组织增生情况;采用 Masson 三色染色法评估滤过道组织中胶原蛋

白沉积和纤维化程度。每张切片在 100 倍镜下选取相同视野照相,采用 Image-Pro plus 6.0 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)计算滤过道内新生胶原纤维面积与整个切片中结膜和巩膜空间总面积的百分比。

1.2.5 免疫组织化学法检测滤过道组织中 CD31 的表达 采用免疫组织化学法检测滤过道周围组织中血管内皮细胞标志物 CD31 的表达。分别取术后 14、28 d 5 μm 的切片,常规脱蜡至水,体积分数 3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶,PBS 冲洗,抗原热修复,正常山羊血清室温下湿孵 20 min,滴加 1:100 稀释的 CD31 一抗,4℃ 过夜,PBS 冲洗,滴加生物素标记羊抗兔 IgG 二抗,37℃ 温箱孵育 20 min,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木素复染,脱水透明,中性树脂封片。参照文献[6]的方法测定微血管密度。40 倍光学显微镜下寻找微血管分布均匀的区域,在 200 倍视野下计数 CD31 阳性表达的血管数目,选择 CD31 阳性表达的血管内皮细胞或其细胞簇,与邻近的微血管或其他结缔组织分开者计为 1 个微血管,计数 4 个视野下的血管数目,取其平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 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 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用完全随机分组和手术前后自身对照实验设计,贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组兔眼手术前后不同时间点眼压变化、滤过泡面积变化的总体比较均采用重复测量两因素方差分析,各组兔眼手术前后不同时间点胶原纤维面积百分比和微血管数目的总体差异比较采用两因素方差分析,多重比较均采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后各组实验兔眼压的比较

贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组术前眼压分别为 (19.80 ± 1.74)、(19.65 ± 1.81)、(20.17 ± 1.69) 和 (19.65 ± 1.77) mmHg,术后第 5 d 贝伐单抗单次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组眼压分别降至最低,分别为 (15.30 ± 1.21)、(14.23 ± 1.10) 和 (16.61 ± 1.70) mmHg,之后眼压逐渐回升,贝伐单抗多次注射组于术后第 9 天眼压降至最低,为 (14.21 ± 1.61) mmHg,之后缓慢回升。不同处理组间眼压差异无统计学意义

($F_{\text{分组}}=0.88, P=0.47$), 不同时间点的眼压差异有统计学意义, ($F_{\text{时间}}=146.68, P=0.02$) (图 1)。

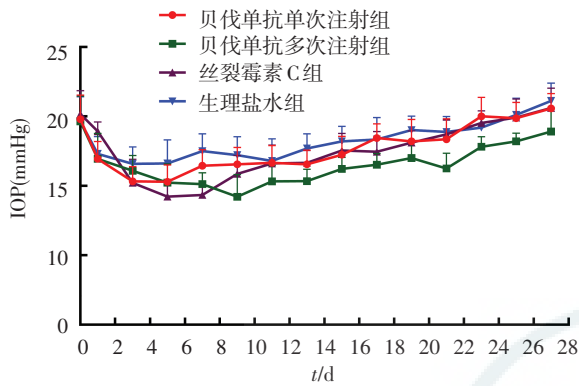


图 1 各组术后实验兔眼压动态变化曲线 IOP:眼压

2.2 各组兔眼滤过泡形态和面积的变化

术后 1~7 d 各组兔眼术区均形成功能性滤过泡, 手术区可见轻度炎症反应, 结膜轻度充血, 术后 4~5 d 充血消失。术后 7 d 贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组滤过泡高度分别为 (1.98 ± 0.12)、(2.81 ± 0.54)、(1.48 ± 0.31) 和 (0.82 ± 0.11) mm, 4 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F=57.31, P=0.01$), 其中贝伐单抗单次注射组和贝伐单抗多次注射组兔眼滤过泡均高于丝裂霉素 C 组和生理盐水组 (图 2), 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。随着术后时间的延长, 各组兔眼滤过泡均逐渐变小、扁平, 术后第 5 天贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组兔眼滤过泡面积依次为

(18.11 ± 1.42)、(20.92 ± 1.02)、(15.01 ± 1.38) 和 (8.35 ± 1.26) mm²。术后第 13 天生理盐水组兔眼滤过泡消失, 术后第 19 天兔眼贝伐单抗单次注射组和丝裂霉素 C 组兔眼滤过泡消失, 术后第 27 天贝伐单抗多次注射组兔眼滤过泡消失。随着时间延长各组兔眼滤过泡面积逐渐缩小, 总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{时间}}=64.21, P=0.01$), 其中术后第 5 天贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组兔眼滤过泡面积均明显大于丝裂霉素 C 组和生理盐水组, 术后第 7~27 天贝伐单抗多次注射组滤过泡面积均明显大于贝伐单抗单次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 3)。

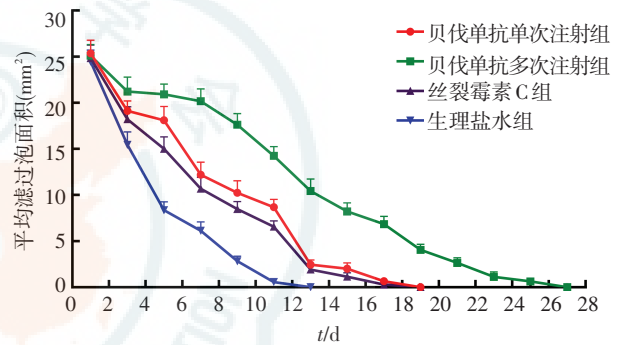


图 3 术后各组实验兔眼滤过泡面积的动态变化曲线

2.3 兔眼滤过泡的组织病理学表现及组织中 CD31 表达

贝伐单抗多次注射组术后 14 d 滤过道周围炎症细胞浸润、胶原沉积、新生血管增生和纤维细胞增生。随手术时间延长, 术后 28 d 时滤过道周围致密胶原纤

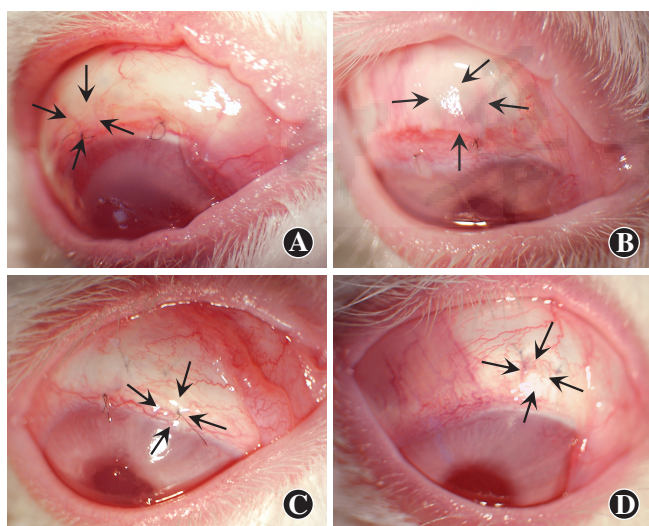


图 2 术后 7 d 各组兔眼滤过泡的形态 A: 贝伐单抗单次注射组滤过泡轻度隆起、弥散 (箭头), 表面可见少量血管 B: 贝伐单抗多次注射组滤过泡高度隆起 (箭头), 形状弥散, 表面血管稀疏 C: 丝裂霉素 C 组兔眼滤过泡扁平 (箭头), 表面血管稀疏 D: 生理盐水组兔眼滤过泡扁平 (箭头), 表面血管密集

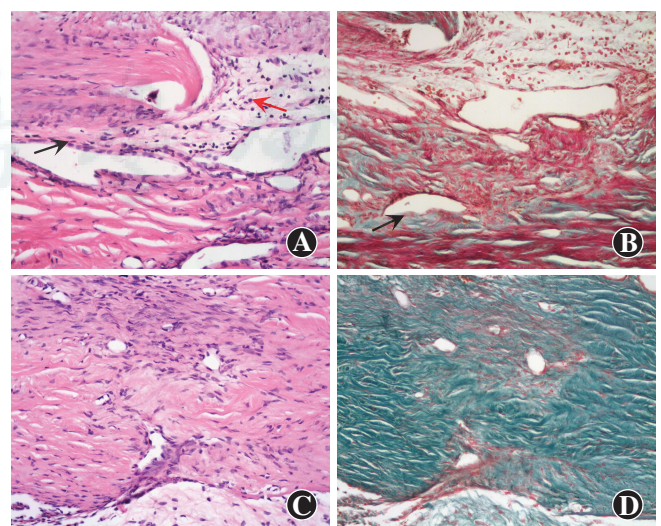


图 4 贝伐单抗多次注射组实验兔眼术后组织病理学改变 A: 术后 14 d 可见术眼滤过道开放, 周围有少量纤维母细胞增生 (黑箭头) 和少量淋巴细胞浸润 (红箭头) (HE ×100) B: 术后 14 d 可见兔眼滤过道周围少量纤维组织增生 (箭头) (Masson ×100) C: 术后 28 d 可见到术区内部分滤过道开放, 周围纤维母细胞数量较术后 14 d 增多 (HE ×100) D: 术后 28 d 滤过道周围大量纤维组织增生 (Masson ×100)

维沉积,滤过道开放程度明显降低(图 4)。免疫组织化学检测显示滤过道周围 CD31 阳性区域新生血管呈黄褐色,管腔直径不等,形状不规则,管壁相对较薄,多由单个或多个血管内皮细胞组成,新生血管密度分布不均匀(图 5)。

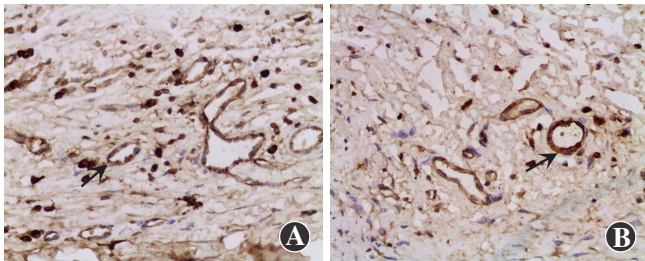


图 5 贝伐单抗多次注射组实验兔术后 CD31 在滤过道组织中的表达(DAB ×200) A:术后 14 d 滤过道周围组织中少量 CD31 阳性细胞,即少量新生血管增生(箭头) B:术后 28 d 滤过道周围组织中可见少量 CD31 阳性细胞(箭头)

2.4 各组兔眼术后不同时间点滤过道胶原纤维增生情况

术后贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组兔眼滤过道胶原纤维占切片中结膜和巩膜总面积的总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 612.41, P = 0.00$),各组兔眼滤过道胶原纤维占切片中结膜和巩膜总面积随着时间延长逐渐增加,总体比较差异有统计学意义($F_{\text{时间}} = 600.56, P = 0.00$),其中贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组和丝裂霉素 C 组兔眼滤过道胶原纤维面积的百分比均低于生理盐水组,且贝伐单抗多次注射组低于贝伐单抗单次注射组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),而贝伐单抗单次注射组与丝裂霉素 C 组间比较差异无统计学意义($P < 0.05$)。术后 28 d 各组兔眼滤过道纤维增生明显,贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组滤过道胶原纤维所占百分比均高于术后 14 d,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 1)。

2.5 各组兔眼术后不同时间点滤过道组织中微血管数目的变化

术后不同时间贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组间兔眼滤过道微血管数目明显不同,总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 121.94, P = 0.00$);贝伐单抗多次注射组兔眼滤过道微血管数目明显少于贝伐单抗单次注射组、丝裂霉素 C 组和生理盐水组,贝伐单抗单次注射组、丝裂霉素 C 组均少于生理盐水组,差异有统计学意义

(均 $P < 0.05$)。各组兔眼滤过道微血管数目总体比较差异有统计学意义($F_{\text{时间}} = 356.27, P = 0.00$),术后 28 d,滤过道周围组织血管多数已退化和消失,各组兔眼滤过道中微血管数目均明显少于术后 14 d,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 1)。

表 1 术后各组兔眼滤过道组织病理学指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	滤过道胶原纤维所占百分比(%)		滤过道微血管数目(视野)	
		术后 14 d	术后 28 d	术后 14 d	术后 28 d
贝伐单抗单次注射组	5	49.18±1.54 ^{ab}	79.60±0.82 ^{ac}	16.72±0.57 ^a	1.23±0.45 ^{ac}
贝伐单抗多次注射组	5	26.41±1.23 ^a	66.82±1.53 ^c	13.13±0.54	3.51±0.31 ^c
丝裂霉素 C 组	5	50.68±1.87 ^{ab}	80.74±1.40 ^{ac}	18.85±0.45 ^a	1.35±0.84 ^{ac}
生理盐水组	5	70.63±1.81	81.16±1.17 ^{ac}	20.36±0.57 ^a	0.82±0.55 ^{ac}

注:滤过道胶原纤维: $F_{\text{分组}} = 612.41, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 600.56, P = 0.00$ 。微血管数目: $F_{\text{分组}} = 121.94, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 356.27, P = 0.00$ 。与各自的贝伐单抗多次注射组比较,^a $P < 0.05$;与生理盐水组比较,^b $P < 0.05$;与各自的术后 14 d 比较,^c $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验)

3 讨论

青光眼滤过手术的成功有赖于术后滤过道的开放情况,理想的青光眼滤过手术是在巩膜下建立功能性滤过通道,将房水引流到结膜下组织,从而起到持久的降低眼压作用。因此青光眼滤过术后纤维细胞的增生和胶原的过度沉积可使滤过道瘢痕化,是导致手术失败的主要原因。青光眼滤过术后伤口的愈合经过炎症反应期、增生期和重塑期,手术创伤导致组织发生炎症反应,活化的血小板释放大量炎症因子和 VEGF,促进血管内皮细胞的增生,形成不成熟的毛细血管芽,最终形成成熟的血管床。新形成的结缔组织和血管共同构成了早期肉芽组织,继而转变为瘢痕组织。研究发现,VEGF 不仅能够促进血管增生,其在成纤维细胞的分化和炎性细胞的迁移方面也发挥重要作用^[4-5]。

贝伐单抗是抗 VEGF-A 的重组人源化含 Fab 与 Fc 片段的全长单克隆抗体,可抑制 VEGF-A 的生物学活性。贝伐单抗在眼科主要用于湿性年龄相关性黄斑变性、脉络膜新生血管、增生性糖尿病视网膜病变、新生血管性青光眼、角膜新生血管等眼部新生血管疾病的治疗^[7-8]。

兔眼球硬度低于人眼, Schiötz 眼压计测量眼压所测数值查对人眼压换算表则所得眼压值明显偏低,故采用双法码校正眼压值表^[9]。本研究中各组兔眼眼压在手术前后不同时间点无明显变化,与 Memarzadeh 等^[10]和 Li 等^[11]的研究相同,因此,眼压在此模型中并非标准指标,主要作为青光眼动物模型建立的评价

标准。

Park 等^[12]研究发现,青光眼滤过手术的成功率与 Tenon 囊内 VEGF 水平呈负相关。青光眼滤过手术后 3 d 术区组织中 VEGF 表达水平开始上调并维持高水平至少 7 d, 术后 13 d 时 VEGF 表达水平下降, 3 周后趋于正常^[13], 提示青光眼滤过术后 3、7 d 结膜下注射抗新生血管药物是降低 VEGF 活性, 抑制滤过道瘢痕化的有利时机。本研究中贝伐单抗多次注射组兔眼滤过泡维持时间最长可达 27 d, 贝伐单抗单次注射组和丝裂霉素 C 组均为 19 d, 生理盐水组为 13 d, 表明术毕结膜下注射 1.25 mg 贝伐单抗在术后早期对维持滤过泡的形态较丝裂霉素 C 有一定的优势, 术后 3、7 d 重复注射可以延缓滤过泡瘢痕化, 与 Sengupta 等^[14]对 38 例白内障合并青光眼患者的临床随机试验结论相同。本研究中还显示, 青光眼滤过术后生理盐水组兔眼滤过泡于术后 13 d 消失, 而贝伐单抗单次注射组、贝伐单抗多次注射组和丝裂霉素 C 组兔眼滤过泡术后 28 d 基本消失, 可能与兔眼组织修复能力较强, 导致滤过泡在数天或几周内瘢痕化有关, 而人组织损伤后修复过程相对缓慢, 贝伐单抗注射效果更好。

本研究中显示, 术后 7 d 贝伐单抗多次注射组滤过泡高度隆起且弥散, 表面血管稀疏, 而生理盐水组滤过泡扁平, 表面血管密集, 表明贝伐单抗在抑制滤过泡表面新生血管的生长, 维持滤过泡的形态方面也起到一定的作用。青光眼滤过术毕结膜下注射贝伐单抗与术中应用丝裂霉素 C 比较, 术后早期滤过泡形态、表面血管分布及术后 14 d 组织病理学结果均显示贝伐单抗注射后滤过道胶原纤维增生和血管化程度低于丝裂霉素 C 组, 说明贝伐单抗抑制滤过道瘢痕化的短期效果优于丝裂霉素 C。术后 14 d, 贝伐单抗组兔眼滤过道组织中的微血管计数少于丝裂霉素 C 组, 而贝伐单抗应用后与丝裂霉素 C 应用后术眼胶原纤维面积百分比无明显差别, 推测贝伐单抗抑制血管增生的效果较抑制胶原纤维生成的作用更明显, 其抗瘢痕化的作用可能是通过抑制新生血管生成和抑制胶原纤维生成而实现的, 其作用机制需进一步研究。本研究中术后 28 d 兔眼滤过道周围纤维结缔组织大量增生, 血管退化, 裂隙灯显微镜下显示滤过泡消失。滤过道组织病理学检查显示, 贝伐单抗多次注射组滤过道仅存留中间部分, 胶原纤维少于贝伐单抗单次注射组、丝裂霉素 C 和生理盐水组, 而新生血管数目多于贝伐单抗单次注射组、丝裂霉素 C 和生理盐水组, 说明贝伐单抗多次注射抗瘢痕化作用更强。

本研究中兔眼小梁切除术毕结膜下注射

25 mg/ml 贝伐单抗 0.05 ml 与术中应用 0.2 mg/ml 浓度丝裂霉素 C 的抗瘢痕化效果进行比较, 发现滤过术毕结膜下注射贝伐单抗的抗瘢痕化作用优于丝裂霉素 C, 术后多次结膜下注射贝伐单抗能延长功能性滤过泡的维持时间。该研究结果为减轻青光眼滤过术后的瘢痕化反应, 提高手术的成功率提供了新的方法。

参考文献

- [1] Lockwood A, Brocchini S, Khaw PT. New developments in the pharmacological modulation of wound healing after glaucoma filtration surgery[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(1): 65-71. DOI: 10.1016/j.coph.2012.10.008.
- [2] Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery[J]. *Surv Ophthalmol*, 2003, 48(3): 314-346.
- [3] Soltau JB, Rothman RF, Budenz DL, et al. Risk factors for glaucoma filtering bleb infections[J]. *Arch Ophthalmol*, 2000, 118(3): 338-342.
- [4] Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing[J]. *J Surg Res*, 2009, 153(2): 347-358. DOI: 10.1016/j.jssn.2008.04.023.
- [5] Wilgus TA, Ferreira AM, Oberyszyn TM, et al. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor[J]. *Lab Invest*, 2008, 88(6): 579-590. DOI: 10.1038/labinvest.2008.36.
- [6] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(2): 169-180.
- [7] Andriolo RB, Puga ME, Belfort JR, et al. Bevacizumab for ocular neovascular diseases: a systematic review[J]. *Sao Paulo Med J*, 2009, 127(2): 84-91.
- [8] Gunther JB, Altaweel MM. Bevacizumab (Avastin) for the treatment of ocular disease[J]. *Surv Ophthalmol*, 2009, 54(3): 372-400. DOI: 10.1016/j.survophthal.2009.02.004.
- [9] Gupta SK, Saxena R, Agarwal R, et al. Estimation of intraocular pressure in rabbits using noncontact tonometer: a comparative evaluation with Schiotz tonometer[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2007, 29(6): 405-409. DOI: 10.1358/mf.2007.29.6.1119161.
- [10] Memarzadeh F, Varma R, Lin LT, et al. Postoperative use of bevacizumab as an antifibrotic agent in glaucoma filtration surgery in the rabbit[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(7): 3233-3237. DOI: 10.1167/iovs.08-2441.
- [11] Li Z, van Bergen T, van de Veire S, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtration surgery[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(11): 5217-5225. DOI: 10.1167/iovs.08-2662.
- [12] Lopilly PHY, Kim JH, Ahn MD, et al. Level of vascular endothelial growth factor in tenon tissue and results of glaucoma surgery[J]. *Arch Ophthalmol*, 2012, 130(6): 685-689. DOI: 10.1001/archophthalmol.2011.2799.
- [13] Bates DO, Jones RO. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing[J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2003, 2(2): 107-120. DOI: 10.1177/1534734603256626.
- [14] Sengupta S, Venkatesh R, Ravindran RD. Safety and efficacy of using off-label bevacizumab versus mitomycin C to prevent bleb failure in a single-site phacotrabeculectomy by a randomized controlled clinical trial[J]. *J Glaucoma*, 2012, 21(7): 450-459. DOI: 10.1097/IJG.0b013e31821826b2.

(收稿日期: 2015-12-12)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)