

伏立诺他羟丙基- β -环糊精滴眼液对小鼠碱烧伤角膜新生血管的抑制作用

杨晶晶 梁珍 卢萍 张振 张俊杰

河南省人民医院眼科 郑州大学人民医院眼科 河南省立眼科医院, 郑州 450003

通信作者: 张俊杰, Email: zhangjunjie@zzu.edu.cn

【摘要】 目的 制备伏立诺他(SAHA)羟丙基- β -环糊精包合物(SAHA-CD)滴眼液,观察其对小鼠碱烧伤角膜新生血管(CNV)的抑制作用。方法 使用羟丙基- β -环糊精包合的方法制备 SAHA 质量分数分别为 0.1%、0.2% 和 0.4% 的 SAHA-CD 滴眼液,采用高效液相色谱法测定滴眼液中 SAHA 含量。取 SPF 级昆明小鼠 75 只,建立右眼角膜碱烧伤模型,采用随机数字表法随机将小鼠分为 5 个组,每组 15 只,其中 0.1% SAHA-CD 组、0.2% SAHA-CD 组、0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组,造模后即刻分别给予相应药物点眼,模型对照组即刻给予 0.9% 氯化钠注射液点眼,每日 4 次,每次 5 μ l,连续 6 d。荧光素钠染色观察角膜上皮愈合情况并采用 EyeStudio 软件计算角膜上皮缺损面积。制作角膜铺片并采用 ImageJ 软件计算 CNV 的长度和面积。采用苏木精-伊红染色法观察角膜组织病理特征。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测角膜组织中血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和基质金属蛋白酶 9(MMP-9)质量浓度。结果 制备的质量分数为 0.1%、0.2% 和 0.4% 的 SAHA-CD 滴眼液中 SAHA 含量分别为标示量的 97.62%、98.33% 和 98.14%。造模后,各组模型眼角膜水肿、混浊。给药第 6 天,各组 CNV 长度和面积总体比较差异均有统计学意义($F=7.655, 8.802$, 均 $P<0.01$),其中 0.2% SAHA-CD 组、0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组 CNV 面积显著小于模型对照组,0.1% SAHA-CD 组、0.2% SAHA-CD 组和地塞米松组 CNV 长度显著小于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。给药第 3 天和第 6 天,各组角膜中 VEGF、bFGF 和 MMP-9 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义(第 3 天: $F=6.345, 7.149, 18.650$, 均 $P<0.01$;第 6 天: $F=6.749, 5.105, 5.023$, 均 $P<0.01$),其中 0.2% SAHA-CD 组角膜中 VEGF、bFGF 和 MMP-9 蛋白表达量均低于 0.1% SAHA-CD 组、0.4% SAHA-CD 组和模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 SAHA-CD 滴眼液可抑制小鼠碱烧伤后 CNV 的形成和发展。

【关键词】 伏立诺他; 角膜新生血管; 碱烧伤; 羟丙基- β -环糊精; 细胞生长因子

基金项目: 国家自然科学基金联合重点项目(U1704283); 河南省科技厅基础与前沿项目(142300410057); 河南省立眼科医院 2022 年基础研究专项(22JCQN006)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200807-00566

Inhibitory effect of vorinostat encapsulated hydroxypropyl- β -cyclodextrin eye drops on corneal neovascularization induced by alkali burns in mouse

Yang Jingjing, Liang Zhen, Lu Ping, Zhang Zhen, Zhang Junjie

Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Henan Eye Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Zhang Junjie, Email: zhangjunjie@zzu.edu.cn

[Abstract] Objective To prepare vorinostat encapsulated hydroxypropyl- β -cyclodextrin (SAHA-CD) eye drops and investigate its inhibitory effect on corneal neovascularization (CNV) induced by alkali burns in mouse.

Methods The SAHA-CD eye drops at concentrations of 0.1%, 0.2% and 0.4% were prepared by inclusion technology with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, and the content was assayed by high performance liquid chromatography. Seventy-five SPF mice with alkali burn-induced CNV were randomized into 0.1% SAHA-CD group, 0.2% SAHA-CD group, 0.4% SAHA-CD group, dexamethasone group and normal control group according to a random number table, 15 for each group, among which the SAHA-CD groups and dexamethasone group were treated with corresponding drugs, and model control group was treated with normal saline immediately after modeling, four times a day and five microliters each time, lasting for six days. The healing of corneal epithelium was examined with a slit

lamp microscope after fluorescein sodium staining, and the areas of cornea epithelial defects were calculated using Eyestudio software. The corneal flat mount was prepared, and the length and areas of CNV were calculated with ImageJ software. The histology of mouse corneas was observed through hematoxylin and eosin staining. The expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in cornea were measured with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The use and care of animals complied with the ARVO statement and this study protocol was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Henan Eye Institute (No. HNEECA-2020-01). **Results** The actual drug contents of the 0.1%, 0.2% and 0.4% SAHA-CD eye drops were 97.62%, 98.33% and 98.14% of the labeled amount. The cornea showed edema and opacification after modeling. On the sixth day after treatment, significant differences were found in the length and areas of CNV among various groups ($F = 7.655, 8.802$; both at $P < 0.01$). The areas of CNV in 0.2% SAHA-CD, 0.4% SAHA-CD and dexamethasone groups were significantly smaller than model control group, and the length of CNV in 0.1% SAHA-CD, 0.2% SAHA-CD and dexamethasone groups were significantly smaller than model control group (all at $P < 0.05$). On the third and sixth day following modeling, significant differences in the expression levels of VEGF, bFGF and MMP-9 were found among the five groups (third day: $F = 6.345, 7.149, 18.650$; all at $P < 0.01$; sixth day: $F = 6.749, 5.105, 5.023$; all at $P < 0.01$), and the expression levels of VEGF, bFGF and MMP-9 in 0.2% SAHA-CD group were significantly lower than those in 0.1% SAHA-CD group, 0.4% SAHA-CD group and model control group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** SAHA-CD eye drops can inhibit alkali burn-induced CNV in mouse.

[Key words] Vorinostat; Corneal neovascularization; Alkali, burns; Hydroxypropyl- β -cyclodextrin; Cell growth factor

Fund program: Joint Key Project of National Natural Science Foundation of China (U1704283); The Bureau of Science and Technology of Henan Province (142300410057); Henan Eye Hospital Basic Research Program (22JCQN006)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200807-00566

角膜需处于透明状态以维持其正常的生理功能,但在感染、外伤、免疫反应等病理情况下,血管会从角膜缘处向角膜中央生长,形成角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV),破坏角膜正常微环境,导致角膜透明性下降和眼前节相关免疫赦免消失。CNV引起的视力下降和移植排斥反应成为目前角膜疾病治疗所面临的突出问题^[1-2]。因此,研究治疗 CNV 的药物对提高 CNV 患者的生存质量具有重要意义。伏立诺他(vorinostat, SAHA)是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,通过诱导细胞分化、凋亡和阻断细胞周期发挥作用,并于 2006 年 10 月 6 日被美国食品药品监督管理局批准用于治疗经 2 个全身治疗方案后仍进展、耐药或复发的具有明显皮肤侵犯的 T 细胞淋巴瘤。近年来,研究发现 SAHA 对 CNV 具有抑制作用^[3-5]。然而 SAHA 的水溶解度较低,生物利用度低,严重影响其眼局部治疗 CNV 的效果。本研究选用羟丙基- β -环糊精作为包合载体,增加 SAHA 在水中的溶解度,将其制备成不同药物浓度的伏立诺他羟丙基- β -环糊精(SAHA-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, SAHA-CD)滴眼液,并研究其对小鼠角膜碱烧伤 CNV 的抑制作用,以期提高其对 CNV 的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 75 只健康雄性 SPF 级 6~8 周龄昆明小鼠购自郑州华兴实验动物养殖场[许可证号:SCXK(豫)2019-0002],体质量 18~22 g。实验动物饲养于河南省食品药品检验所动物房,5 只/笼,实验期间自由饮水进食。实验动物的使用与饲养均遵循视觉与眼科研究协会制定的科研动物使用规范,本研究方案经河南省眼科研究所实验动物伦理委员会审核批准(批文号:HNEECA-2020-01)。

1.1.2 主要试剂及仪器 SAHA(北京百灵威科技有限公司);羟丙基- β -环糊精(西安德立生物有限公司);质量分数 0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司);地塞米松磷酸钠滴眼液(新乡华青药业有限公司);小鼠血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、小鼠碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) ELISA 试剂盒、小鼠基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase, MMP-9) ELISA 试剂盒(武汉

伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。CJB-S-10D 多点磁力搅拌器(郑州长城仪器有限公司);2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);SLM-8E 裂隙灯显微镜(重庆康华瑞明科技股份有限公司);TS-100C 恒温振荡器[匡贝实业(上海)有限公司];酶标仪(美国 PerkinElmer 公司);ZOOM-200 手术显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司);荧光显微镜(日本尼康公司);FRESCO 低温高速离心机[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 SAHA-CD 滴眼液的制备 根据药效学研究的一般原则和该药物兔眼刺激性预实验结果,本研究拟制备 SAHA 质量分数为 0.1%、0.2% 和 0.4% 的 SAHA-CD 滴眼液。取 3 个清洁干燥烧杯,均加入注射用水 20 ml,分别加入羟丙基- β -环糊精 0.4、0.8 和 1.6 g,然后分别加入 SAHA 0.02、0.04 和 0.08 g,均加入甘油 0.3 g,搅拌均匀,加热至 65 °C,搅拌至药物完全溶解,冷却至室温,转移至量筒中加注射用水至 20 ml,成功制备质量分数为 0.1%、0.2% 和 0.4% 的 SAHA-CD 滴眼液。取滴眼液用针头式无菌过滤器(滤膜孔径为 0.22 μm ,爱尔兰 Merck Millipore 公司)过滤后,采用高效液相色谱仪测定药物含量,应为标示量的 90%~110%。

1.2.2 小鼠角膜碱烧伤模型的建立 参照文献[6-7]的方法建立碱烧伤小鼠 CNV 模型:质量分数 1% 戊巴比妥钠按照 80 mg/kg 的剂量给予小鼠腹腔内注射进行全身麻醉,采用质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点右眼进行角膜表面麻醉,充分暴露小鼠右眼角膜;将 1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 μl 滴于直径 2 mm 圆形滤纸片上,静置 5 s,将滤纸片均匀地贴于小鼠右眼角膜中央并静置 20 s,取下滤纸后用 20 ml 0.9% 氯化钠注射液迅速冲洗结膜囊 1 min,建立碱烧伤诱导的小鼠 CNV 模型。

1.2.3 实验分组及给药 将造模成功的小鼠按照随机数字表法随机平均分成模型对照组、0.1% SAHA-CD 组、0.2% SAHA-CD 组、0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组,每组 15 只,模型眼分别于模型建立后立即给予 0.9% 氯化钠注射液、0.1% SAHA-CD、0.2% SAHA-CD、0.4% SAHA-CD 和地塞米松磷酸钠滴眼液点眼,4 次/d,5 μl /次,共给药 6 d;给药后间隔 10 min 均使用头孢唑林钠滴眼液 5 μl 点眼以预防感染。

1.2.4 裂隙灯显微镜观察 CNV 情况 造模后每日在裂隙灯显微镜下观察各组小鼠角膜和前房情况,分别于给药后 3 d 和 6 d,用裂隙灯显微镜拍照记录 CNV 生长情况。

1.2.5 角膜铺片及 CNV 长度和面积计算 参照文献[8]的方法,于造模后第 6 天,每组分别任意选取 3 只小鼠,1% 戊巴比妥钠按照 80 mg/kg 的剂量腹腔内注射进行全身麻醉,固定于泡沫板上,手术剪刀剪开胸腔,充分暴露心脏和肝脏,将注射针头插入小鼠左心室,同时将小鼠右心耳剪开,灌注黑色墨水直至四肢和眼球变黑,颈椎脱臼法处死小鼠。摘除右眼眼球,于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中 4 °C 固定过夜,去除晶状体及虹膜组织,保留角膜缘及完整角膜组织,将角膜沿角膜缘向角膜中央方向均匀切成 4 瓣,置于载玻片上制成角膜整铺片,封片胶封片,光学显微镜下观察并拍照,ImageJ 软件测量 CNV 的长度和面积。每瓣角膜按角膜缘平分选 5 个点,每个点处测量 CNV 向角膜中央生长的长度,4 瓣角膜共 20 个点的 CNV 长度平均值即为该小鼠 CNV 长度。由 ImageJ 软件计算出每瓣角膜 CNV 面积,4 瓣角膜 CNV 面积之和即为该小鼠 CNV 面积。

1.2.6 角膜组织病理学检查 于造模第 6 天,每组任意选取 2 只小鼠,腹腔内注射过量 1% 戊巴比妥钠溶液后,颈椎脱臼法处死,立即摘取右眼眼球,同时收集任意 2 只小鼠左眼眼球作为正常眼角膜组织,观察角膜组织的病理状态。将摘取的眼球置于 4% 多聚甲醛溶液中 4 °C 固定过夜,保留角膜缘及完整的角膜组织并去除角膜边缘虹膜组织,置于 10% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,石蜡包埋后平行于眼轴方向 3 μm 厚连续切片,进行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察并拍照。

1.2.7 ELISA 法检测角膜组织中蛋白质量浓度 分别于造模后第 3 天和第 6 天,每组任意选取 5 只小鼠,腹腔内注射过量 1% 戊巴比妥钠溶液后,颈椎脱臼法处死小鼠,剪取右眼角膜,精密称质量后,置于 -80 °C 冰箱中备用。取出角膜,放至室温,加入 100 μl 蛋白裂解液,冰浴中浸泡 1 h,4 °C 下低温高速离心机(离心半径 6 cm) 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清,取 25 μl 上清液用样品稀释液稀释 10 倍后,取 100 μl 加入各孔,37 °C 孵育 90 min;倒去孔内液体,加入 100 μl 生物素化抗体工作液,37 °C 孵育 60 min;洗涤液洗涤 3 次,加入 100 μl 酶结合物工作液,37 °C 孵育 30 min;洗涤液洗涤 5 次,加入 90 μl 底物溶液,37 °C 孵育 15 min,加入 50 μl 终止液,立即在波长 450 nm 处测定吸光度(A)值,计算各蛋白质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中各计量资料数据经 W 检验证

实符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组小鼠角膜 CNV 长度和面积, VEGF、bFGF 和 MMP-9 蛋白质量浓度总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAHA-CD 滴眼液含量

经高效液相色谱方法测定,制备的 0.1%、0.2% 和 0.4% SAHA-CD 滴眼液 SAHA 含量分别为标示量的 97.62%、98.33% 和 98.14%,符合滴眼液的含量要求,可在本实验研究中使用。

2.2 各组模型眼 CNV 生长情况

各组模型眼造模后均见角膜水肿、混浊,角膜中央有与滤纸片大小相同、边界清晰的灰白色烧灼区。造模后 0 d,各组模型眼角膜缘血管扩张充血,均可见少量细小新生血管长入角膜缘;造模后 3 d,各组新生血管呈毛刷状包绕角膜缘,其中模型对照组和 0.1% SAHA-CD 组新生血管较密集;造模后 6 d,模型对照组和 0.1% SAHA-CD 组新生血管较长,角膜缘充血,新生血管有继续生长趋势,0.2% SAHA-CD 组新生血管无明显长出,0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组新生血管短且稀疏,角膜缘充血消退(图 1)。各组 CNV 长度和面积总体比较,差异均有统计学意义($F=7.655、8.802$,均 $P<0.01$)。0.1% SAHA-CD 组、0.2% SAHA-CD 组、0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组 CNV 长度短于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);0.2% SAHA-CD 组、0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组 CNV 面积小于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 2,表 1)。

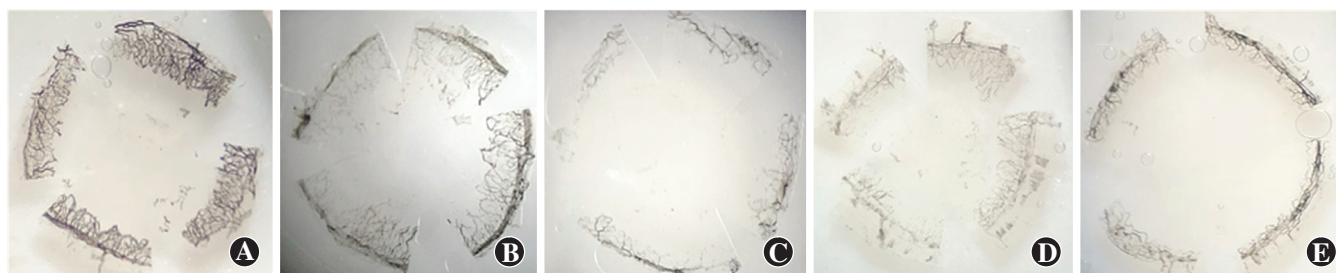


图 2 各组模型眼角膜平铺片 模型对照组新生血管密集且长;0.1% SAHA-CD 组和 0.4% SAHA-CD 组新生血管长但较稀疏;0.2% SAHA-CD 组和地塞米松组新生血管短且稀疏 A:模型对照组 B:0.1% SAHA-CD 组 C:0.2% SAHA-CD 组 D:0.4% SAHA-CD 组 E:地塞米松组

Figure 2 Corneal flat mounts of model eyes New blood vessels were long and dense in model control group, long and sparse in 0.1% SAHA-CD group and 0.4% SAHA-CD group, short and sparse in 0.2% SAHA-CD group and dexamethasone group A: model control group B: 0.1% SAHA-CD group C: 0.2% SAHA-CD group D: 0.4% SAHA-CD group E: dexamethasone group

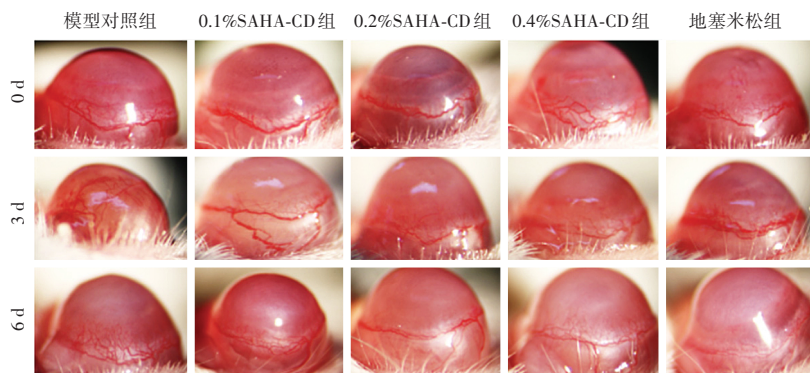


图 1 各组造模后不同时间点模型眼 CNV 生长情况 造模后 0 d,各组模型眼角膜缘血管扩张充血;造模后 3 d,各组模型眼均有新生血管长出,模型对照组和 0.1% SAHA-CD 组新生血管较其他组密集;造模后 6 d,模型对照组和 0.1% SAHA-CD 组新生血管较长,角膜缘充血,新生血管有继续生长趋势,0.2% SAHA-CD 组新生血管无明显长出,0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组新生血管短且稀疏,角膜缘充血消退 SAHA-CD:伏立诺他羟丙基- β -环糊精包合物

Figure 1 CNV formation at different time points after modeling The day after modeling, the corneal limbus of model eyes were congested. On the third day after modeling, the neovascularization was growing, which was denser in model control group and 0.1% SAHA-CD group than other groups. On the sixth day after modeling, the new blood vessels were long and dense in model control group and 0.1% SAHA-CD group with the corneal limbus congested, showing a tendency to continue growing, while the new blood vessels were short and sparse in 0.4% SAHA-CD group and dexamethasone group with the congestion of corneal limbus subsided, and almost no new blood vessels were found in 0.2% SAHA-CD group SAHA-CD: vorinostat-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex

2.3 各组模型眼角膜组织病理学变化

组织病理学染色结果显示,正常小鼠角膜表面光滑,细胞间紧密连接,上皮层由 4~6 层细胞构成,厚度均一,基质层排列规则,纤维连接紧密。造模后 6 d,各组角膜上皮细胞层数减少,呈大泡状病变,排列不规则,基质层水肿增厚,基质纤维排列紊乱,模型对照组角膜基质层可见新生血管管腔;0.1% SAHA-CD 组和 0.4% SAHA-CD 组角膜胶原纤维排列紊乱;0.2% SAHA-CD 组和地塞米松组角膜基质排列较规则,角膜上皮修复基本完整,新生血管管腔数目明显少于模型对照组(图 3)。

表 1 各组模型眼 CNV 长度和面积比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of CNV length and area among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	CNV 长度 (mm)	CNV 面积 (mm ²)
模型对照组	3	0.399±0.121	13.820±2.744
地塞米松组	3	0.097±0.008 ^a	4.251±2.336 ^a
0.1% SAHA-CD 组	3	0.302±0.007 ^{ab}	11.502±0.911 ^b
0.2% SAHA-CD 组	3	0.178±0.033 ^{abc}	9.024±1.284 ^{abc}
0.4% SAHA-CD 组	3	0.388±0.092 ^{abd}	9.676±1.430 ^{ab}
F 值		7.655	8.802
P 值		0.008	0.003

注:与模型对照组比较,^a $P < 0.05$;与地塞米松组比较,^b $P < 0.05$;与 0.1% SAHA-CD 组比较,^c $P < 0.05$;与 0.2% SAHA-CD 组比较,^d $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) CNV:角膜新生血管;SAHA-CD:伏立诺他羟丙基-β-环糊精包合物

Note: Compared with model control group, ^a $P < 0.05$; compared with dexamethasone group, ^b $P < 0.05$; compared with 0.1% SAHA-CD group, ^c $P < 0.05$; compared with 0.2% SAHA-CD group, ^d $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) CNV: corneal neovascularization; SAHA-CD: vorinostat-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex

2.4 各组模型眼角膜组织中 VEGF、bFGF、MMP-9 蛋白质量浓度比较

造模后第 3 天, 各组角膜组织 VEGF、bFGF、MMP-9 蛋白质量浓度总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 6.345, 7.149, 18.650$, 均 $P < 0.01$), 其中, 0.1% SAHA-CD 组、0.2% SAHA-CD 组、0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组角膜组织中 VEGF 蛋白质量浓度均低于模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 0.1% SAHA-CD 组和 0.4% SAHA-CD 组角膜组织中 VEGF 蛋白质量浓度均高于 0.2% SAHA-CD 组和地塞米松组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 0.1% SAHA-CD 组、0.2% SAHA-CD 组、0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组角膜组织中 bFGF 蛋白质量浓度均低于模型对照组, 0.4% SAHA-CD 组角膜组织中 bFGF 蛋白质量浓度高于 0.1% SAHA-CD 组和 0.2% SAHA-CD 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 0.1%

SAHA-CD 组、0.2% SAHA-CD 组和 0.4% SAHA-CD 组角膜组织中 MMP-9 蛋白质量浓度均低于模型对照组和地塞米松组, 0.1% SAHA-CD 组和 0.4% SAHA-CD 组角膜组织中 MMP-9 蛋白质量浓度低于 0.2% SAHA-CD 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。造模后第 6 天, 各组 VEGF、bFGF、MMP-9 蛋白质量浓度总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 6.749, 5.105, 5.023$, 均 $P < 0.01$); 其中, 0.2% SAHA-CD 组、0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组角膜组织中 VEGF 蛋白质量浓度均低于模型对照组和 0.1% SAHA-CD 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。0.4% SAHA-CD 组角膜组织中 bFGF 蛋白质量浓度低于 0.1% SAHA-CD 组和 0.2% SAHA-CD 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 0.2% SAHA-CD 组和 0.4% SAHA-CD 组角膜组织中 MMP-9 蛋白质量浓度低于 0.1% SAHA-CD 组、模型对照组和地塞米松组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

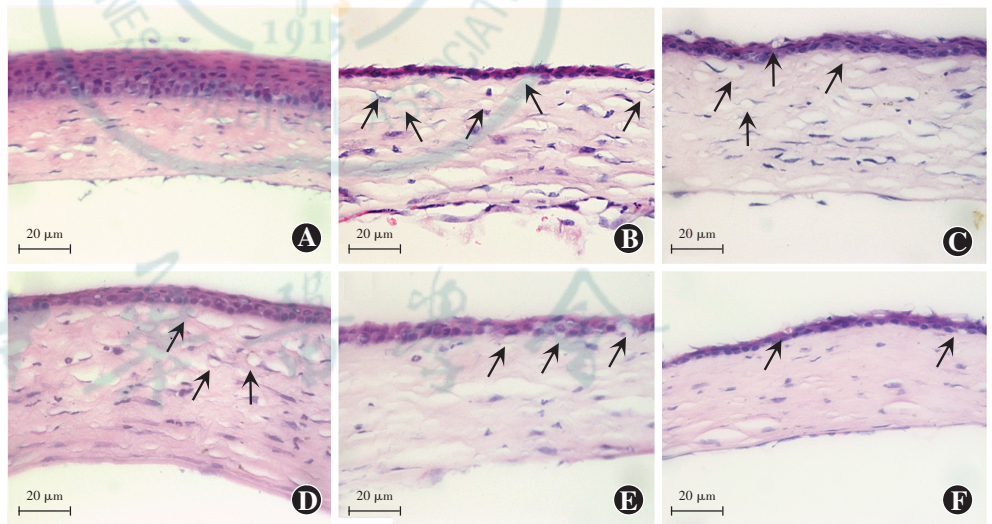


图 3 各组角膜组织碱烧伤区组织病理学变化 (HE ×400, 标尺 = 20 μm) 正常角膜表面光滑, 上皮细胞紧密连接, 基质层排列规则; 造模后 6 d, 各组角膜基质层水肿增厚, 其中模型对照组和 0.1% SAHA-CD 组基质纤维皱缩, 间隙增大, 可见血管管腔 (箭头), 0.2% SAHA-CD 组、0.4% SAHA-CD 组和地塞米松组基质水肿减轻, 仅可见少量血管管腔 (箭头), 角膜上皮愈合, 基质纤维排列较整齐 A: 正常小鼠角膜 B: 模型对照组 C: 0.1% SAHA-CD 组 D: 0.2% SAHA-CD 组 E: 0.4% SAHA-CD 组 F: 地塞米松组

Figure 3 Histopathology of alkali-burned mouse corneas (HE ×400, bar = 20 μm) The surface of normal cornea was smooth with tightly connected epithelial cells and regularly arranged stromal layer. On the 6th day after modeling, the corneal stromal layer in each group showed edema and thickened, and the stromal layer of model control group and 0.1% SAHA-CD group were shrunken with increased gap and visible vascular lumens (arrow). The edema of stromal layer was reduced in 0.2% SAHA-CD group, 0.4% SAHA-CD group and dexamethasone group with only a few visible vascular lumens (arrow), showing healing corneal epithelium and regular stromal layer A: normal cornea B: model control group C: 0.1% SAHA-CD group D: 0.2% SAHA-CD group E: 0.4% SAHA-CD group F: dexamethasone group

表 2 各组模型眼不同时间点角膜组织中 VEGF、bFGF、MMP-9 质量浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g}/\mu\text{g}$)
Table 2 Comparison of VEGF, bFGF and MMP-9 concentrations in alkali-burned mouse cornea among different groups at different time points ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g}/\mu\text{g}$)

组别	眼数	造模后 3 d			造模后 6 d		
		VEGF	bFGF	MMP-9	VEGF	bFGF	MMP-9
模型对照组	5	2.11±0.43	1.33±0.24	0.41±0.04	2.23±0.35	1.66±0.28	0.31±0.09
地塞米松组	5	0.71±0.15 ^a	0.97±0.08 ^a	0.50±0.03	1.25±0.22 ^a	1.32±0.13 ^a	0.29±0.03
0.1% SAHA-CD 组	5	1.32±0.44 ^{ab}	0.76±0.20 ^a	0.38±0.05 ^{ab}	2.10±0.34 ^b	1.47±0.22	0.36±0.07
0.2% SAHA-CD 组	5	0.95±0.08 ^{ac}	0.75±0.18 ^a	0.22±0.07 ^{abc}	1.28±0.24 ^{ac}	1.34±0.18 ^a	0.23±0.04 ^{abc}
0.4% SAHA-CD 组	5	1.56±0.31 ^{abd}	1.19±0.18 ^{acd}	0.28±0.03 ^{abd}	1.65±0.49 ^{ac}	1.07±0.29 ^{acd}	0.23±0.04 ^{abc}
F 值		6.345	7.149	18.650	6.749	5.105	5.023
P 值		0.003	0.001	<0.001	0.005	0.001	0.008

注:与模型对照组比较,^a $P<0.05$;与地塞米松组比较,^b $P<0.05$;与 0.1% SAHA-CD 组比较,^c $P<0.05$;与 0.2% SAHA-CD 组比较,^d $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) VEGF:血管内皮生长因子; bFGF:碱性成纤维细胞生长因子; MMP-9:基质金属蛋白酶-9; SAHA-CD:伏立诺他羟丙基- β -环糊精包合物

Note: Compared with model control group, ^a $P<0.05$; compared with dexamethasone group, ^b $P<0.05$; compared with 0.1% SAHA-CD group, ^c $P<0.05$; compared with 0.2% SAHA-CD group, ^d $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) VEGF: vascular endothelial growth factor; bFGF: basic fibroblast growth factor; MMP-9: matrix metalloproteinase-9; SAHA-CD: vorinostat-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex

3 讨论

据统计,每年约有 140 万人发生 CNV,其中 12% 的患者因此最终丧失视力^[9]。眼部烧伤患者在眼外伤中约占 18%,其中超过 80% 的角膜烧伤是由化学试剂,包括染料、酸、碱等引起的,而碱性物质可导致角膜上皮缺损、溃疡、CNV 及角膜瘢痕等严重的眼部损伤^[10-11]。由于角膜碱烧伤比酸损伤更常见,因此,近年来 CNV 的研究多聚焦于碱烧伤模型^[12-13]。应用碱性试剂氢氧化钠溶液对小鼠角膜中央进行烧灼模拟碱烧伤后 CNV 的模型,具有操作简单、重复性好、接近临床等特点^[14]。故本研究中采用碱烧伤模型来研究 SAHA 对 CNV 的抑制效果。

SAHA 是一种抑制组蛋白脱乙酰基酶的新型抗癌药物。有研究结果显示,SAHA 可通过抑制新生血管、新生淋巴管和炎症反应等抑制 CNV^[15-18]。SAHA 为难溶性药物,其在 25 °C 条件下水溶解度约为 71.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。Li 等^[5]将 SAHA 用二甲基亚砜溶解后,用缓冲盐稀释成一定浓度后进行点眼给药,证实其对 CNV 具有抑制作用,但存在有机溶剂的细胞毒性作用。HP- β -CD 是一种安全、有效的药物增溶剂和吸收促进剂,具有水溶性强、热稳定性高、安全性高等特性,易与药物形成包合物,进而提高药物溶解度和生物利用度,是近年来广泛应用的药物制剂新型辅料^[19-21]。SAHA 可被包合于 HP- β -CD 分子空腔中形成包合物,具有很高的分散度,同时由于 HP- β -CD 的亲水性,使包合物具有良好的可润湿性,达到增加溶解度的目的,

从而改善 SAHA 的生物利用度。本研究通过 HP- β -CD 包合技术将 SAHA 制备成可用于给药的滴眼液,在未加有机溶剂的条件下大大增加了 SAHA 在水中的溶解度,可以有效提高 SAHA 的生物利用度。由于眼部特殊生理结构,滴眼液滴入眼内,药物生物利用度仅为 1%~7%。有研究表明,10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SAHA 有抑制胰腺癌细胞增生作用,25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SAHA 则对人角膜上皮细胞有轻微毒性^[4,22]。郑靖等^[23]研究表明,受试者单次口服 SAHA 400 mg 后半衰期约为 2.0 h,该药物半衰期短,消除快。因此,本研究中采用 SAHA 质量分数为 0.1%、0.2% 和 0.4% 的滴眼液进行实验。

正常角膜是无血管透明组织,角膜的无血管性对于维持视力至关重要。CNV 是与角膜化学性烧伤、角膜炎症及角膜移植排斥反应密切相关的常见病理现象,其发生机制复杂。在角膜感染、化学烧伤等情况下,由于血管生成刺激和抗血管生成刺激之间的不平衡,导致多种生长因子,如 VEGF、bFGF 和 MMP-9 等促血管生长因子过度表达,诱导角膜出现新生血管,而碱烧伤被认为是导致新生血管的因素之一,并可能对角膜组织和视功能造成严重损害^[24-26]。因此,抑制碱烧伤后血管生长因子,如 VEGF、bFGF 和 MMP-9 的表达可能抑制 CNV 的发生。Chang 等^[27]研究发现,VEGF、bFGF 和 MMP-9 在病理性及生理性血管形成过程中起重要作用,这些因子在正常角膜上皮、角膜内皮、角膜缘血管内皮细胞中均有表达,在 CNV 内皮细胞中表达明显增多。

本研究通过比较各组小鼠角膜碱烧伤后角膜上皮

缺损面积、CNV 长度和面积发现, SAHA-CD 滴眼液可有效抑制小鼠碱烧伤后 CNV 生长、促进碱烧伤后角膜上皮的愈合, 以及减少角膜水肿和角膜基质胶原纤维紊乱。本研究结果还显示, 小鼠角膜碱烧伤后第 3 天和第 6 天, 0.2% SAHA-CD 组和 0.4% SAHA-CD 组小鼠角膜中 VEGF、bFGF 和 MMP-9 蛋白质量浓度均低于模型对照组, 表明 SAHA-CD 滴眼液可有效抑制小鼠角膜碱烧伤后促血管生长因子 VEGF、bFGF 和 MMP-9 的表达, 但其抑制作用与药物浓度之间的关系以及具体作用机制仍需进一步研究。

地塞米松通过抑制碱烧伤后的炎症反应发挥抑制新生血管的作用, 其对碱烧伤诱导的 CNV 有明显抑制作用^[28]。但地塞米松等皮质类固醇能激活胶原酶, 增加胶原酶的组织溶解作用, 延缓修复过程, 严重者可导致角膜溃疡加剧和穿孔^[29], 其长期应用还会带来青光眼、白内障等并发症。孙亚杰等^[30]研究发现, 妥布霉素地塞米松滴眼液可能抑制角膜上皮生长。本研究选择地塞米松作为阳性对照, 观察 SAHA 对小鼠角膜碱烧伤后 CNV 的抑制作用。

综上所述, SAHA-CD 滴眼液制备方法简单, 且可有效抑制小鼠角膜碱烧伤后新生血管的生长, 可能与其抑制小鼠角膜碱烧伤后促血管生长因子 VEGF、bFGF 和 MMP-9 的表达有关。本研究为 SAHA 治疗 CNV 的后续相关研究提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 杨晶晶: 配酿和设计实验、实验研究、采集数据、分析和解释数据、撰写文章; 梁珍、卢萍: 实施研究、采集数据、数据统计分析; 张振: 实施研究、采集数据; 张俊杰: 配酿和设计实验、对文章的知识性内容作批判性审阅及定稿

参考文献

- [1] Liu X, Lin Z, Zhou T, et al. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of SERPINA3K on corneal injury [J/OL]. PLoS One, 2011, 6(1): e16712 [2011-08-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304961>. DOI: 10.1371/journal.pone.0016712.
- [2] Kandeel S, Balaha M. Opatadine enhances recovery of alkali-induced corneal injury in rats [J]. Life Sci, 2018, 207: 499-507. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.07.002.
- [3] Gronkiewicz KM, Giuliano EA, Kuroki K, et al. Development of a novel *in vivo* corneal fibrosis model in the dog [J]. Exp Eye Res, 2016, 143: 75-88. DOI: 10.1016/j.exer.2015.09.010.
- [4] Tandon A, Tovey JC, Waggoner MR, et al. Vorinostat: a potent agent to prevent and treat laser-induced corneal haze [J]. J Refract Surg, 2012, 28(4): 285-290. DOI: 10.3928/1081597X-20120210-01.
- [5] Li X, Zhou Q, Hanus J, Anderson C, et al. Inhibition of multiple pathogenic pathways by histone deacetylase inhibitor SAHA in a corneal alkali-burn injury model [J]. Mol Pharm, 2013, 10(1): 307-318. DOI: 10.1021/mp300445a.
- [6] Kim JW, Jeong H, Yang MS, et al. Therapeutic effects of zerumbone in an alkali-burned corneal wound healing model [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 48: 126-134. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.05.005.
- [7] 高奕晨, 路晓晓, 张彩杰, 等. 溴芬酸钠滴眼液对碱烧伤诱导大鼠角膜新生血管的抑制作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(3): 171-179. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.03.003. Gao YC, Lu XX, Zhang CJ, et al. Inhibitory effect of bromfenac sodium hydrate ophthalmic solution on alkali burn induced-corneal neovascularization in rats [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(3): 171-179. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.03.003.
- [8] Li Z, Yao L, Li J, et al. Celastrol nanoparticles inhibit corneal neovascularization induced by suturing in rats [J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 1163-1173. DOI: 10.2147/IJN.S27860.
- [9] Feizi S, Azari AA, Safapour S. Therapeutic approaches for corneal neovascularization [J/OL]. Eye Vis (Lond), 2017, 4: 28 [2021-09-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29234686>. DOI: 10.1186/s40662-017-0094-6.
- [10] Ferrari G, Bignami F, Giacomini C, et al. Safety and efficacy of topical infliximab in a mouse model of ocular surface scarring [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(3): 1680-1688. DOI: 10.1167/iovs.12-10782.
- [11] Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review [J]. Surv Ophthalmol, 1998, 43(3): 245-269. DOI: 10.1016/s0039-6257(98)00035-6.
- [12] Altan S, Sağsöz H, Oğurtan Z. Topical dimethyl sulfoxide inhibits corneal neovascularization and stimulates corneal repair in rabbits following acid burn [J]. Biotech Histochem, 2017, 92(8): 619-636. DOI: 10.1080/10520295.2017.1371333.
- [13] Pokhrel PK, Loftus SA. Ocular emergencies [J]. Am Fam Physician. 2007, 76(6): 829-836.
- [14] Liu CH, Wang Z, Sun Y, et al. Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies [J]. FASEB J, 2017, 31(11): 4665-4681. DOI: 10.1096/fj.201700336R.
- [15] Zhou H, Jiang S, Chen J, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid suppresses inflammation-induced neovascularization [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2014, 92(10): 879-885. DOI: 10.1139/cjpp-2014-0117.
- [16] Anderson C, Zhou Q, Wang S. An alkali-burn injury model of corneal neovascularization in the mouse [J/OL]. J Vis Exp, 2014, (86): 51159 [2021-10-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24748032>. DOI: 10.3791/51159.
- [17] Shuttleworth SJ, Bailey SG, Townsend PA. Histone deacetylase inhibitors: new promise in the treatment of immune and inflammatory diseases [J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(11): 1430-1438. DOI: 10.2174/1389450111009011430.
- [18] Kitano A, Okada Y, Yamanka O, et al. Therapeutic potential of trichostatin A to control inflammatory and fibrogenic disorders of the ocular surface [J]. Mol Vis, 2010, 16: 2964-2973.
- [19] 齐红艺, 李莉, 吴纯洁, 等. 羟丙基-β-环糊精在眼用制剂中的应用进展 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(18): 1539-1543, 1551. DOI: 10.3321/j.issn.1003-3734.2006.18.008. Qi HY, Li L, Wu CJ, et al. Advantage of hydroxypropyl-β-cyclodextrin in ophthalmic preparations [J]. Chin J New Drugs, 2006, 15(18): 1539-1543, 1551. DOI: 10.3321/j.issn.1003-3734.2006.18.008.
- [20] Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery [J]. J Pharm Sci, 1996, 85(11): 1142-1169. DOI: 10.1021/js960075u.
- [21] 陈香, 徐雯. 眼表药物递送系统新进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(12): 1091-1096. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200123-00038. Chen X, Xu W. Advances of ocular surface drug delivery system [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38(12): 1091-1096. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200123-00038.
- [22] 饶慕圣, 徐兴东, 曹胜华, 等. 伏立诺他抑制胰腺癌 PANC-1 细胞增



- 殖及其血管生成拟态的相关研究[J]. 中华全科医学, 2019, 17(7): 1081-1086. DOI: 10. 16766/j. cnki. issn. 1674-4152. 000868.
- Rao MS, Xu XD, Cao SH, et al. Study of the inhibition effect of SAHA on cell proliferation and vasculogenic mimicry in pancreatic cancer PANC-1 cells[J]. Chin J Gen Pract, 2019, 17(7): 1081-1086. DOI: 10. 16766/j. cnki. issn. 1674-4152. 000868.
- [23] 郑靖, 秦永平, 苗佳, 等. 伏立诺他在皮肤 T 细胞淋巴瘤患者的药代动力学研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(21): 2118-2120. DOI: 10. 13699/j. cnki. 1001-6821. 2015. 21. 010.
- Zheng J, Qin YP, Miao J, et al. Pharmacokinetic study of vorinostat in cutaneous T cell lymphoma patients[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2015, 31(21): 2118-2120. DOI: 10. 13699/j. cnki. 1001-6821. 2015. 21. 010.
- [24] Hamill CE, Bozorg S, Peggy Chang HY, et al. Corneal alkali burns: a review of the literature and proposed protocol for evaluation and treatment[J]. Int Ophthalmol Clin, 2013, 53(4): 185-194. DOI: 10. 1097/HO. 0b013e31829ceefa.
- [25] Chang JH, Garg NK, Lunde E, et al. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review[J]. Surv Ophthalmol, 2012, 57(5): 415-429. DOI: 10. 1016/j. survophthal. 2012. 01. 007.
- [26] Stevenson W, Cheng SF, Dastjerdi MH, et al. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: ranibizumab (Lucentis) vs bevacizumab (Avastin)[J]. Ocul Surf, 2012, 10(2): 67-83. DOI: 10. 1016/j. jtos. 2012. 01. 005.
- [27] Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2001, 12(4): 242-249. DOI: 10. 1097/00055735-200108000-00002.
- [28] 石蕊, 薛雨顺, 杨乐, 等. 地塞米松对兔角膜新生血管组织中 IL-1 β 及 TNF- α 表达的影响[J]. 国际眼科杂志, 2014, 14(9): 1574-1577. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2014. 09. 04.
- Shi R, Xue YS, Yang L, et al. Influence of dexamethasone on IL-1 β and TNF- α expression in rabbit corneal neovascularization[J]. Int Eye Sci, 2014, 14(9): 1574-1577. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2014. 09. 04.
- [29] 廖琼, 刘翔. 角膜新生血管形成机制研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2004, 22(2): 213-215. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2004. 02. 029.
- Liao Q, Liu X. Vascularization regulation factor and corneal neovascularization[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2004, 22(2): 213-215. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2004. 02. 029.
- [30] 孙亚杰, 李爱朋, 潘志强. 几种抗炎滴眼液对兔角膜上皮损伤和愈合影响的实验研究[J]. 眼科, 2012, 21(3): 166-171.
- Sun YJ, Li AP, Pan ZQ. The effects of anti-inflammatory eye drops on injury and healing of rabbit corneal epithelium[J]. Ophthalmol CHN, 2012, 21(3): 166-171.

(收稿日期: 2021-11-21 修回日期: 2022-06-07)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

消息

中译版《RETINA RYAN 视网膜(原书第 6 版)》正式出版

英文原著《Ryan's Retina Sixth Edition》是誉冠全球的经典视网膜研究专著,自 1989 年首版以来,一直被欧洲和美国的眼底病医生誉为眼底病领域的“圣经”,至今已 5 次再版,目前为第 6 版。中译版《RETINA RYAN 视网膜(原书第 6 版)》由首都医科大学附属北京同仁医院眼科周楠博士独立翻译,由北京同仁医院眼科魏文斌教授主审,并有幸邀请学贯中西的惠延年教授为此译本做序,将于 2022 年 6 月 6 日(国际爱眼日)正式出版发行。

原著《Ryan's Retina Sixth Edition》由 Andrew P. Schachat, C. P. Wilkinson, David R. Hinton, Srinivas R. Sadda, Peter Wiedemann 等教授联合国际著名眼底病领域的专家倾力编著,是国际上公认为经典、实用的关于眼底病诊断与治疗的眼科学巨著,由 Elsevier 出版社出版,目前仅第 4 版有中文译版。本译著为原书第 6 版中译版,周楠博士在翻译过程中秉承认真、严谨的科学态度,力求在忠于原著的基础上做到信·达·雅。

该书分为上、中、下 3 卷本,共 159 篇。上卷共 4 篇 41 章,对视网膜影像及诊断、解剖学及生理学、视网膜损伤机制、遗传学、基础科学及临床转化进行深入论述;中卷共 55 章,详尽阐释视网膜变性和营养不良、视网膜血管病、脉络膜血管/Bruch 膜病、炎症性病变/葡萄膜炎及药物相关、光损伤、妊娠相关、视盘发育异常及外伤性视网膜病变的发生机制和诊疗方法;下卷共 63 章,详细介绍视网膜脱离巩膜扣带手术和玻璃体切除手术方法和机制以及视网膜、脉络膜和玻璃体肿瘤的诊疗原则和临床实践。

该书全面展示当今眼底病检查、诊断、治疗的最新理念和技术,代表了目前国际眼底病临床诊疗和应用基础进展的前沿研究,新版原著在既往经典知识的基础上更新了国际上相关的标准诊疗规范,增加了近年来眼科在 OCTA、视网膜干细胞移植、人工视网膜、人工智能等里程碑式突破性创新的国际前沿科技知识和进展,融入了创新药物的临床试验结果,是眼底病知识体系经典与创新的融合和发展。

该书是国际经典眼科学译著,由中国科学技术出版社出版,印刷精美,包含大量高清美图,便于广大眼科医师直观地理解深奥的眼科学知识和手术的精细操作,是眼科研究生、住院医师和视网膜内、外科医生学习眼底病基础知识和最新临床实践的力作。

《RETINA RYAN 视网膜(原书第 6 版)》共 2 683 页,铜版纸彩色印刷,定价 1 980 元;全国各大书店和网上商城均可订购。

(本刊编辑部)

