文章编号:1000-5404(2008)13-1287-04

论著

脉络膜上腔置入糖皮质激素药膜对兔视网膜的保护作用

李立婕,金中秋 (广州军区武汉总医院眼科,武汉 430070)

摘 要 目的 探讨在眼内炎的治疗中,脉络膜上腔置入曲安奈德壳聚糖药膜与玻璃体腔注射曲安奈德对视网膜的不同影响。方法 30 只健康青紫蓝兔右眼玻璃体腔注射 ATCC25923 标准金黄色葡萄菌 10^5 CFU/ml 混悬液 0.1 ml 建立眼内炎模型。24 h 后随机将实验动物分为 3 组,每组 10 只眼进行不同干预,A(玻璃体腔万古霉素)组、B(玻璃体腔万古霉素 + 曲安奈德混悬剂)组、C[玻璃体腔万古霉素 + 脉络膜上腔置入壳聚糖缓释药膜(载药曲安奈德)]组。干预后每日间接眼底镜观察;注射细菌后 24 h 及干预后 14 d 所有实验动物行眼部玻璃体腔及视网膜 B 超检查;造模前及干预后14 d 行视网膜电图(electroretinogram, ERG)检查,干预 14 d 后处死所有动物行光镜、电镜观察。结果 C 组较 A、B 组炎症明显减轻。A、B、C 各组临床炎症评分有显著性差异($P < 0.05$);B 超显示视网膜脱离 A、B、C 各组间有显著性差异($P = 0.015$);ERG 检查 A、B 组实验前后 ERG b 波波幅平均值有显著性差异($P = 0.000$);C 组 b 波波幅平均值前后无显著性差异;A 与 B、B 与 C、A 与 C 组间 b 波波幅有显著性差异($P = 0.015$、$P = 0.001$、$P = 0.000$);光镜下 C 组视网膜结构完整,层次分明,病理评分 A、B、C 各组间有显著性差异($P < 0.05$);电镜下观察视网膜色素上皮层 C 组细胞器结构完整,少见细胞质空泡化,B 组细胞核染色质分布不均,细胞质空化,细胞器破坏。结论 脉络膜上腔置入壳聚糖药膜在眼内炎治疗中对视网膜具有明显正性保护作用。

关键词:壳聚糖膜;曲安奈德;脉络膜上腔;玻璃体腔注射;视网膜/毒性
中图法分类号:R322.91;R771.05;R977.11 文献标识码:A

Glucocorticosteroid membrane implanted into perichoroidal space protects retina of rabbit endophthalmitis

LI Li-jie, JIN Zhong-qiu (Department of Ophthalmology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of implantation of chitosan membrane with triamcinolone (TA) into perichoroidal space combined with intraocular vancomycin injection on the protection of retina in rabbit endophthalmitis. Methods The drug membrane was made of gelatin-chitosan. The right eyes of 30 normal pigment rabbits were inoculated intravitreally with 0.1 ml mixture of 10^5 CFU standard strain *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Twenty-four hours later, rabbits were equally randomized to intravitreal vancomycin group (Group A), intravitreal vancomycin and TA eye dropping (Group B), and intravitreal vancomycin combined with TA membrane implantation (Group C). Clinical observation of ocular fundus was done every day with indirect ophthalmofundoscope. B ultrasound examination was carried out in 24 h after inoculation and on the 14th day after therapy. Electroretinogram (ERG) was done before therapy and the 14th day after therapy. Histopathologic grading and electron microscopy were carried out at the 14th day. Results After implanting the drug membrane into perichoroidal space, the inflammation in group C was markedly less than the other 2 groups, and its inflammation score was significantly lowest ($P < 0.05$). Retinal detachment occurred less in the group C than in the other 2 groups. ERG demonstrated that dark adaptation b wave amplitude before the treatment was dropped more dramatically in groups A and B than those after treatment, but there was no difference in group C before and after the treatment. Significant difference was found in the wave amplitude after the treatment between groups A and B, groups B and C, and groups A and C. Electron microscopy shows that the retinal pigment epithelium(RPE) structure of group C was intact and cellular organs well-arranged. There was no statistical difference between groups A and B in histopathologic grading. Conclusion Implantation of chitosan membrane with TA into perichoroidal space combined with intraocular vancomycin injection can protect the retina during the treatment course of endophthalmitis.

Key words: chitosan; triamcinolone; perichoroidal space; intravitreal injection; retina/toxic

作者简介:李立婕,女,湖南省湘乡市人,硕士研究生,主要从事眼外伤方面的研究。电话:13335388866
通信作者:金中秋,电话:(027)68878708
收稿日期:2007-07-17;修回日期:2007-10-28

前眼内炎的治疗方法中,公认的方法仍然是早期玻璃体腔注射万古霉素,而糖皮质激素的给予方式及时间一直没有定论。临床上激素给药主要有4种方式——局部给药、全身给药、眼内给药和眼周给药。尽管局部给药能够穿过结膜弥散进入眼内组织,但很难达到有效浓度。全身给药虽然可将药物运送至眼内,但其较大剂量不可避免会产生明显的副作用。玻璃体腔注药提供了将药物运送至眼后节最直接的方法,但是仍存在很多潜在的副作用,如:视网膜脱离,出血和白内障[1]。玻璃体腔置入装置的出现一定程度上解决了玻璃体腔重复给药的难题,但是各种置入玻璃体腔的装置均以眼内手术为基础,因而除了具有与玻璃体腔注射相同的副作用外,还有对手术要求高,风险大,难于广泛施行的弊端。基于上述原因,我们试图探求一条新的给药途径——脉络膜上腔置入载有曲安奈德药膜,既充分发挥糖皮质激素强大抗炎作用,又不对眼内组织造成直接损害。本研究主要探讨此给药方式对视网膜的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株、药膜制备、药品和设备

1.1.1 金黄色葡萄球菌菌株 由第四军医大学病理科惠赠。ATCC25923标准金黄色葡萄菌株接种于培养基,置37 ℃培养。制备细菌混悬液浓度至10^4CFU/0.1 ml放入4 ℃冰箱备用。

1.1.2 壳聚糖缓释药膜制备[2] 药膜采用将一定量的壳聚糖溶于15 g/L的乙酸水溶液中,用砂芯漏斗抽滤,配制成20 g/L的壳聚糖溶液。明胶溶于60 ℃超纯水中,过滤,配制成25 g/L的溶液。将上述2种溶液按照明胶和壳聚糖体积比1∶3在60 ℃恒温水浴中充分混合。将200 mg曲安奈德混悬剂溶于适量超纯水,加入上述溶液中。超声波振荡1 h保持振荡温度低于80 ℃,静置,脱泡,慢慢倾倒在塑料培养皿中,50 ℃烘干成直径6 cm圆形壳聚糖药膜,干燥状态下厚度0.2 mm,质硬。制备完成后经直线加速器辐射消毒,无菌袋过塑料存。

1.1.3 主要药品和设备 曲安奈德:曲安奈德注射液40 mg/ml(昆明积大制药有限公司,批号:040708);万古霉素500 mg/瓶,Eli Lilly Japan K.K公司生产。手术显微镜:日本产TOPCON,OMS-300型;超声仪:Humphrey SYSTEM Model 837;光学显微镜:日本产OLYMPUS,CH型;透射电镜:日立H-300型。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 健康青紫蓝兔30只,雌雄不拘,体质量2.5~3.0 kg(广州军区武汉总医院实验中心提供)。随机分为3组:A、B、C组各10只,右眼为实验眼。造模前30 min复方托吡酰胺散大瞳孔,氯霉素冲术眼。复方氯胺酮注射液(50 mg/kg)肌肉注射麻醉,盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉。常规眼科消毒、铺巾,于右眼颞上方约10点角膜缘后3 mm处以无菌带1 ml注射器进针,先抽出玻璃体约0.1 ml,随后注入金黄色葡萄球菌ATCC 25923细菌混悬液0.1 ml以保持眼压平衡[3]。

1.2.2 玻璃体腔给药 玻璃体内注射细菌24 h后,所有动物按前述麻醉及消毒方法操作后先抽出0.1 ml玻璃体做细菌培养,随后A组玻璃体腔注射万古霉素10 mg/ml[4],B组万古霉素10 mg/ml+曲安奈德1 ml(4 mg),C组万古霉素10 mg/ml+脉络膜上腔置入壳聚糖药膜。

1.2.3 壳聚糖缓药膜的置入 经麻醉及消毒后,等量利多卡因及布比卡因混合球结膜下浸润麻醉,剪开球结膜,在12点处用11号尖刀片在距离角膜缘3 mm处做平行切口,长约5 mm。用虹膜恢复器贴近巩膜面,轻轻分开巩膜与脉络膜的疏松连接。分离出一长约5 mm的空腔,随后将复水后的7 mm×7 mm药膜置入空腔内,用虹膜恢复器将其展平,缝合巩膜及结膜,术中无脉络膜出血。所有手术操作由同一医师完成。

1.3 评估指标

1.3.1 临床炎症评分 每日间接眼底检查。于3、7、14 d分别对各组动物进行眼内炎临床分级,分级标准参照文献[5]。

1.3.2 B超检查[6] 注射细菌后24 h及出干预后14 d所有动物行眼部玻璃体腔及视网膜B超检查。观察玻璃体及视网膜脱离情况。

1.3.3 视网膜电图(electroretinogram, ERG)检查[7] 造模前及干预后14 d行ERG检查。固定架固定实验兔,暗适应30 min,托品酰胺充分散瞳,0.5%地卡因滴眼液表面麻醉。将作用电极置于角膜表面,参考电极分别置于靠近两眼额部皮下和耳缘部皮下。兔头部置于刺激球内中央,按照国际电生理协会标准进行记录。

1.3.4 组织学检查 干预后14 d时,将所有动物过量氯胺酮处死(50 mg/kg,肌肉注射),常规制片并HE染色。光学显微镜下观察并进行病理分级,标准参照文献[8]。

1.3.5 电镜观察 剖开的眼球另一半放入戊二醛内固定3 h,常规电镜制片并染色。

1.4 统计学方法

采用SPSS 11.0统计软件统计学分析。视网膜脱离发生率比较采用的比较采用χ^2检验。各组病理视网膜分级采用多组等级资料的比较Kruskal-Wallis检验,组间比较采用Mann-Whitney检验方法。

2 结果

2.1 临床观察

注入细菌后24 h后间接眼底镜观察见玻璃体腔积脓(A组8/10,B组7/10,C组8/10)。干预后3组实验动物玻璃体混浊均不同程度减轻。B组玻璃体混浊,眼底朦胧,C组玻璃体腔轻度混浊,眼底清晰可见。

2.2 B超检查

注入细菌后24 h,眼部玻璃体腔及视网膜B超检查提示:多数实验动物玻璃体腔形成积脓,脉络膜增厚见图1,未见由手术。干预后14 d再次行B超检查,经χ^2检验进行分析显示:A、B、C 3组之间视网膜脱离有显著性差异($P=0.015$)。A、B组之间无统计学意义($P=0.606$),B、C组间与A、C组间有显著性差异($P<0.05$)。

2.3 ERG检查

3组实验兔均行暗适应闪光ERG检测,确认A、B、C 3组间实验前b波波幅平均值无显著性差异($P=0.966$),检测结果显示:实验前后A、B组ERG b波波幅平均值有显著性差异($P=$

0.000，$P=0.000$）；实验前后 C 组 b 波波幅平均值无显著性差异；实验后 A、B、C 3 组两两组间 b 波波幅均有显著性差异，A、B 组间 $P=0.015$，B、C 组间 $P=0.001$，A、C 组间 $P=0.000$（表 1）。



↑：积脓形成；⬆：脉络膜明显增厚

图 1　B 超显示 24 h 玻璃体腔

表 1　术前、术后 14 d ERG b 波波幅变化情况（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	注药前	注药 14 d 后	P_1
A 组	206.97 ± 13.41	78.35 ± 23.17	0.000
B 组	205.20 ± 15.74	117.13 ± 44.42	0.000
C 组	205.68 ± 17.06	18.3.56 ± 25.68	0.320
P_0	0.966	0.001	

P_0：A、B、C 3 组间比较；P_1：各组术前术后比较

2.4　组织学检查

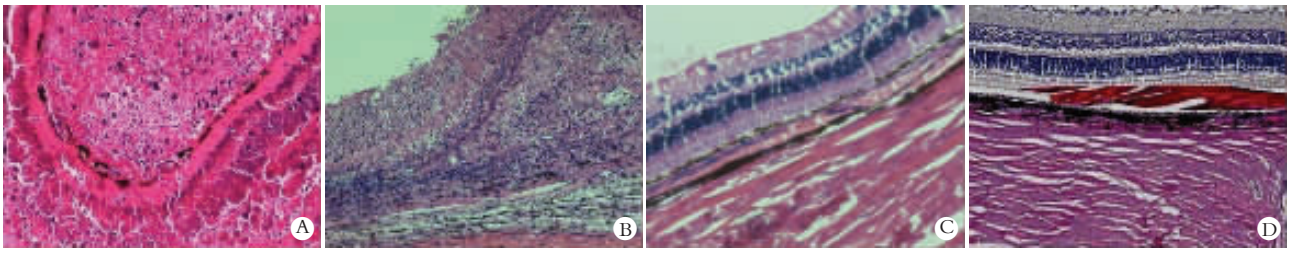
干预后 14 d，大体标本可见，A、B 组玻璃体腔均有积脓，A 组玻璃体腔满腔似干酪样坏死物及变性的玻璃体，B 组玻璃体腔积脓稀薄，未占满整个玻璃体腔，C 组药膜置入处微隆起，缝线可见。玻璃体腔无脓肿形成。光镜下各组视网膜结构 A 组可见玻璃体体腔均质红染，炎细胞浸润，视网膜结构紊乱，视网膜各层细胞广泛坏死（图 2A），B 组可见玻璃体腔局部红染，散在的炎细胞浸润，视网膜结构基本正常，外颗粒层分布紊乱，神经上皮层脱失，视网膜脱离可见（图 2B）；C 组玻璃体腔未见明显变性的玻璃体，视网膜各层次分明，结构清晰，脉络膜血管增粗，充血明显（图 2C），C 组可见间隙处均质红染处系置药膜处，可见未降解的均质红染壳聚糖药膜，未见炎细胞浸润，未见明显纤维增生，无局部毒性作用，周围组织结构完整（图 2D）。A、B、C 3 组视网膜分级有显著性差异 $P=0.000$，A、B 组间视网膜分级 $P_{AB}=0.007$，B、C 组间视网膜分级 $P_{BC}=0.015$，A、C 组间视网膜分级 $P_{AC}=0.000$（图 2）。

2.5　电镜检查

干预 14 d，透射电镜下可见，A 组视网膜色素上皮层细胞（RPE）正常形态几乎消失，大量空泡样改变，细胞器不能辨认，细胞核呈不规则形，细胞质空泡样改变（图 3A）。C 组视网膜色素上皮层细胞形态规则，细胞器显示清晰（图 3C），细胞核呈规则，核内染色质分布均匀，散在黑色素颗粒。B 组介于两者之间，RPE 细胞细胞核呈不规则形，核内染色质分布欠均匀，部分细胞质空泡样改变，细胞膜尚规则（图 3B）。

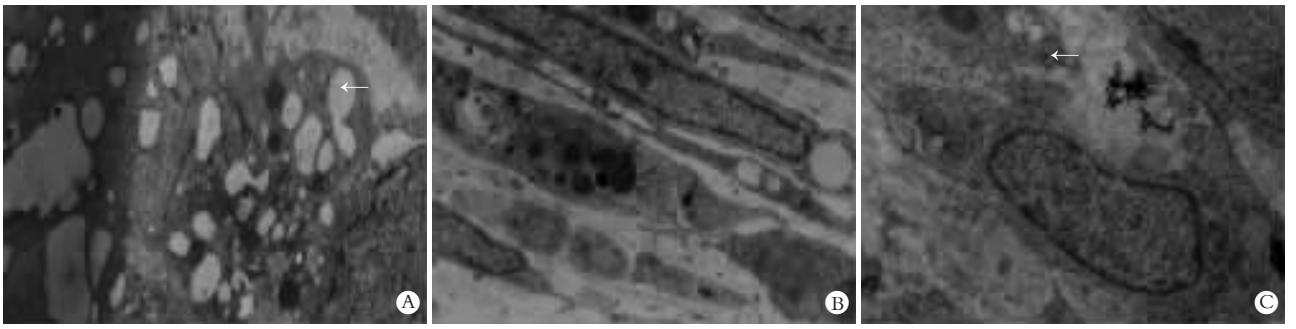
3　讨论

在革兰阳性菌感染的眼内炎中，金黄色葡萄球菌被列为最常见的菌群之一。早在 1995 年 Jett 等建立产毒性肠球菌眼内炎进行实验研究，玻璃体腔同时注射地塞米松和抗菌素组对视网膜结构和功能的保护作用明显提高，Yoshisuzumi 等[9] 也曾就地塞米松不同的给药时间对疗效的影响进行详细的论证。近年来 Gan 等[10] 通过实验再次验证了玻璃体腔注射地塞米松作为辅助用药在眼内炎治疗中对视网膜组织的保护作用，但是这些实验结果并没有得到广泛的认可，Meredith 等[11] 通过建立金黄色葡萄球菌性眼内炎实验模



A：A 组（HE × 100）；B：B 组（HE × 40）；C：C 组视网膜（HE × 100）；D：C 组脉络膜上腔放置药膜处（HE × 100）

图 2　干预 14 d 光镜观察



A：A 组　↑：RPE 细胞；B：B 组；C：C 组　↑：黑色素颗粒

图 3　干预 14 d 后视网膜色素细胞层电镜观察　（酯酸钠、枸橼酸铅染色 × 5 000）

型进行了系统的实验研究得到了与以往实验完全相反的结果即玻璃体腔注射地塞米松在眼内炎治疗中加速了对视网膜的破坏。所以,目前激素在眼内炎治疗中的应用与否仍然各执一词。

我们考虑是否可以通过改变激素给药途径以寻找上述两种不同结果差异的根源。基于这种设想,本实验通过建立金黄色葡萄球菌性眼内炎模型,采用公认有效且对视网膜无毒副作用的万古霉素玻璃体腔注射联合脉络膜上腔置入载有曲安奈德的壳聚糖药膜进行治疗,实验结果显示,不同时间点临床观察见 C 组玻璃体腔尚清,眼底较清晰,而 B 组玻璃体腔积脓,眼底显示不清。B 超结果提示 B 组视网膜脱离较 C 组多见。光镜观察显示,C 组玻璃体腔仅少许炎细胞浸润,视网膜结构完整,各层结构清晰可见,而 B 组玻璃体腔有积脓,视网膜结构层次虽然也基本能够辨认,但其内、外颗粒层结构紊乱,神经上皮层脱失;透射电镜观察见 B 组 RPE 细胞细胞核呈不规则型,核内染色质分布欠均匀,细胞器基本能够辨认,细胞膜尚规则;而 C 组 RPE 细胞形态规则,细胞器显示清晰。ERG 检查结果显示 C 组网膜功能无明显损害,而 B 组网膜功能下降。ERG 结果与视网膜组织学改变相对应。实验结果充分证明脉络膜上腔置入 TA 壳聚糖药膜治疗效果明显优于玻璃体腔注射 TA。

壳聚糖-明胶共混药膜具有良好的组织相容性,药膜早期有暴释现象释放量达 120 μg/ml,2 d 后,体系每日释药量逐渐趋于平稳,维持有效释药浓度接近 20 d[4],壳聚糖膜作为药物载体在眼科应用的安全性也到了广泛证实[12-14],同时,脉络膜上腔[15]是巩膜与脉络膜之间的潜在腔隙,将载有 TA 的壳聚糖药膜置入与此具有以下优点:①避免结膜下给药无法通过致密坚硬的巩膜层进入眼内达到有效药物浓度;②药物通过丰富的脉络膜血管吸收,吸收速度快,能够迅速得到达病变部位,吸收完全,发挥作用更加充分;③脉络膜与视网膜相邻,紧密贴在一起,既能够充分的发挥激素的抗炎作用,同时避免了与视网膜的直接接触极大程度上的避免了 TA 对视网膜的破坏作用,避免玻璃体腔脓肿对药物发挥作用的局限性。由于高浓度细菌感染发病迅猛,浓密的玻璃体腔积脓限制了 TA 的渗透作用,导致其在病变部位达不到有效浓度,无法充分发挥抗炎作用。光镜、电镜及 ERG 检查充分证明了脉络膜上腔给药组对维持视网膜结构完整及功能具有正性保护作用。实验结果表明眼内炎治疗中糖皮质激素作为辅助用药是必需的,而通过改变糖皮质激素给药途径或许能够为解决以往的观点分歧提供一种新的思路。Olsen 等[16]就脉络膜上腔套管置入系统进行了实验研究并证明了其安全性及可行性,认为该途径用药将成为一种有效、针对性强的后节给药途径。金中秋等[17]将壳聚糖药膜置入脉络膜上腔治疗眼病也取得了肯定的疗效。本实验脉络膜上腔置入壳聚糖药膜国内外文献中罕见报道,且目前仅限于动物实验,要确证该法在眼内炎治疗中对视网膜组织具有正性保护作用仍需要进行大量的研究。

参考文献:

[1] Jager R D, Aiello L P, Patel S P, *et al*. Risks of intravitreous injection: a comprehensive review[J]. Retina, 2004, 24(5): 676-698.

[2] 高玉香,闫玉华,金中秋, 等. 明胶-壳聚糖共混载药膜的体外释药特性[J]. 武汉理工大学学报, 2005, 27(11): 24-26.

[3] Giese M J, Mondino B J. Experimental staphylococcal endophthalmitis[J]. Ophthalmologica, 2001, 215(5): 321-336.

[4] Engelbert M, Mino-de-Kaspar H, Thiel M, *et al*. Intravitreal vancomycin and amikacin versus intravenous imipenem in the treatment of experimental Staphylococcus aureus endophthalmitis[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2004, 242(4): 313-320.

[5] Peyman G A, Paque J T, Meisels H I, *et al*. Postoperative endophthalmitis: a comparison of methods for treatment and prophlaxis with gentamicin[J]. Ophthalmic Surg, 1975, 6(1): 45-55.

[6] Puodziuviene E, Paunksnis A, Kurapkiene S, *et al*. Ultrasound value in diagnosis, management and prognosis of severe eye injuries[J]. Ultragarsas, 2005, 56(3): 40-43.

[7] Jain V K, Dawson W W, Engel H M, *et al*. Electroretinograms in early fungal endophthalmitis[J]. Doc Ophthalmol, 1988, 69(3): 227-235.

[8] Park S S, Samiy N, Rouff K, *et al*. Effect of intravitreal dexamethasone in treatment of pneumococcal endophthalmitis in rabbits[J]. Arch Ophthalmol, 1995, 113(10): 1324-1329.

[9] Yoshizumi M O, Lee G C, Equi R A, *et al*. Timing of dexamethasone treatment in experimental Staphylococcus aureus endophthalmitis[J]. Retina, 1998, 18(2): 130-135.

[10] Gan I M, Ugahary L C, van-Dissel J T, *et al*. Intravitreal dexamethasone as adjuvant in the treatment of postoperative endophthalmitis: a prospective randomized trial[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2005, 243(12): 1200-1205.

[11] Meredith T A, Aguilar H E, Drews C, *et al*. Intraocular dexamethasone produces a harmful effect on treatment of experimental Staphylococcus aureus endophthalmitis[J]. Trans Am Ophthalmol Soc, 1996, 94: 241-257.

[12] 高玉香,阎玉华. 天然生物可降解材料作为缓释载体的应用进展[J]. 国外建材科技, 2005, 26(5): 20-23.

[13] 金中秋, 商旭敏, 周和政, 等. 壳聚糖膜缓释给药系统在小梁切除术中的应用[J]. 眼科新进展, 2007, 27(1): 30-33.

[14] 商旭敏,金中秋,周和政, 等. 壳聚糖膜在兔眼巩膜瓣下的降解及对眼内压的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(4): 338-341.

[15] Guyer D, Schachat A, Green R. The choroid: structural considerations[M]// Ryan S. Retina. 4th ed. St Louis: Mosby, 2006: 33-42.

[16] Olsen T W, Feng X, Wabner K, *et al*. Cannulation of the suprachoroidal space: a novel drug delivery methodology to the posterior segment[J]. Am J Ophthalmol, 2006, 142(5): 777-787.

[17] 张庆华, 金中秋, 宋艳萍, 等. 脉络膜上腔不同给药途径治疗葡萄膜炎的实验研究[J]. 眼科新进展, 2003, 23(4): 257-259.

(编辑 王 红)