文章编号:1000-5404(2010)11-1203-04

论著

姜黄素眼膏对兔小梁切除术后滤过道瘢痕化的抑制作用

郑奇君,李平华 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科)

[摘要] **目的** 研究姜黄素眼膏对兔实验性小梁切除术后滤过道瘢痕的影响。**方法** 将27只新西兰大白兔按体质量分层随机分为对照组、基质组、姜黄素组,每组9只,均选右眼行标准小梁切除术。术后对照组不做特殊处理;基质组给予约0.1 g眼膏基质,3次/d;姜黄素组给予约0.1 g姜黄素眼膏,3次/d。分别观察3组眼压、滤过泡、炎性细胞、胶原、成纤维细胞和肌成纤维细胞。**结果** 术前,术后1、3、28 d 3组眼压值差异不明显($P>0.05$),术后7、14、21 d 3组眼压值有明显差异($P<0.05$)。术后7 d时姜黄素组与对照组和基质组间的炎性细胞比较差异有统计学意义($P<0.05$)。而术后14、28 d 3组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。姜黄素组各个时间点的Ⅰ型胶原量[7 d(21.62±2.87)%,14 d(27.83±2.37)%,28 d(33.47±2.79)%]与对照组[7 d(29.71±1.31)%,14 d(36.83±1.73)%,28 d(47.13±1.85)%]和基质组[7 d(31.07±1.67)%,14 d(38.09±1.17)%,28 d(48.13±1.69)%]比较差异有统计学意义($P<0.05$),但Ⅲ型胶原差异无统计学意义($P>0.05$)。姜黄素组的成纤维细胞和肌成纤维细胞与对照组和基质组比较有显著差异($P<0.05$)。**结论** 姜黄素眼膏可抑制成纤维细胞和肌成纤维细胞增生,减少Ⅰ型胶原分泌,有效延缓滤过泡瘢痕化进程。

[关键词] 青光眼;小梁切除术;姜黄素;瘢痕
[中图法分类号] R287.81; R619.6; R779.606 **[文献标志码]** A

Effect of curcumin eye ointment on scar formation in filtering blebs after trabeculectomy in rabbits

Zheng Qijun, Li Pinghua (Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of curcumin ointment on scar formation in filtering blebs after trabeculectomy in rabbits. **Methods** Twenty-seven rabbits (27 eyes) were randomly divided into control group, and matrix (placebo) group, and curcumin group, 9 in each group. Trabeculectomy for right eyes was performed on all rabbits. Eyes in control group were not treated with any drug, eyes in matrix group were smeared with 0.1 g common eye ointment (3 times a day), and eyes in curcumin group were smeared with 0.1 g curcumin eye ointment (3 times a day). Then, intraocular pressure (IOP), filtering blebs, inflammatory cells, collagen, fibroblasts and myofibroblasts were detected by immunohistochemical staining. **Results** No significant difference was observed in IOP among the 3 groups before and 1, 3, 28 d after operation. However, a significant difference was found in IOP among the 3 groups in 7, 14 and 21 d after operation ($P<0.05$). The number of inflammatory cells was larger in curcumin group than in matrix and control groups in 7 d after operation ($P<0.05$). However, the number of inflammatory cells was similar in 3 groups in 14 and 28 d after operation. In 7, 14 and 28 d after operation, the type 1 collagen accounted for (21.62±2.87)%, (27.83±2.37)%, and (33.47±2.79)% in curcumin group, (29.71±1.31)%, (36.83±1.73)%, and (47.13±1.85)% in control group, and (31.07±1.67)%, (38.09±1.17)%, and (48.13±1.69)% in matrix group, respectively, ($P<0.05$). No difference was found in type 3 collagen. The number of fibroblasts and myofibroblasts was larger in curcumin group than in matrix and control groups ($P<0.05$). **Conclusion** Curcumin eye ointment can inhibit the proliferation of fibroblasts and myofibroblasts, reduce the secretion of type 1 collagen, and delay the scar formation in filtering blebs.

[Key words] glaucoma; trabeculectomy; curcumin

Corresponding author: Li Pinghua, Tel: 86-23-89011242, E-mail: cylipinghua@.163.com

[通信作者] 李平华,电话:(023)89011242,E-mail:cylipinghua@.163.com

青光眼是世界上第2大致盲性眼病,滤过性的小梁切除术仍是目前治疗青光眼的主要术式。术后滤过泡的瘢痕化直接影响滤过术的成功率。现阶段用于临床抗滤过泡瘢痕化的药物主要是5-氟尿嘧啶和丝裂霉素,但会引起严重并发症。姜黄素(Curcumin)是从姜科姜黄属,植物姜黄、莪术、郁金等的根茎中提取的一种天然有效成分,具有广泛的药理作用,如抗肿瘤[1]、抗炎、抗氧化、抗人类免疫缺陷病毒等。最近研究表明其还具有抗肺等纤维化的功效[2],而且无明显毒副作用[3],但将其用于抗青光眼术后滤过泡瘢痕的疗效如何尚有待实验证实。本实验将姜黄素制备成眼膏用于兔眼小梁切除术后的抗瘢痕化研究,欲寻找更加安全有效的抗滤过道瘢痕药物。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

姜黄素(Sigma公司),速眠新Ⅱ(长春军需兽医研究所),鼠抗人波形蛋白单克隆抗体和鼠抗人α平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(北京中杉),天狼星红(Sigma公司)。

1.2 实验动物及分组

新西兰大白兔27只,体质量2.0~2.5 kg,雌雄不限,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供并饲养,按体质量分层随机分为对照组(仅做小梁切除术)、基质组(小梁切除术+眼膏基质)、姜黄素组(小梁切除术+姜黄素眼膏)3组,每组9只。术前3 d连续监测兔眼双眼眼压(Tonopen-XL眼压计),以确定实验动物的基础眼压(如同只兔子双眼眼压差值超过3个单位则排除)。并进行裂隙灯显微镜、间接眼底镜等常规眼科检查以排除其他眼科疾病。

1.3 姜黄素眼膏的配置

姜黄素眼膏的配置浓度为5%(通过预实验筛选确定)由姜黄素和眼膏基质组成,其中眼膏基质由黄凡士林、液状石蜡、羊毛脂以8∶1∶1的比例配置(第三军医大学西南医院药剂科协助下完成)。

1.4 兔青光眼滤过手术模型制备

术前氯霉素眼药水点双眼1 d。手术均由同一位熟练的术者进行。均选择鼻上或颞上象限做以角膜缘为基底的结膜瓣,行标准的小梁切除术。术毕,0.5%盐酸金霉素眼膏和硫酸阿托品眼膏点术眼。每组术眼术后每日均点氯霉素眼药水(连续3 d)。基质组:点眼膏基质,3次/d,约0.1 g/次;姜黄素组:5%姜黄素眼膏,3次/d,约0.1 g/次;对照组不予特殊处理。

1.5 一般观察

由同一检查者采用盲法完成。①术后裂隙灯下观察眼刺激征、结膜、角膜、前房、虹膜及晶状体情况。②观察滤过泡形态。根据Kenfeld分型法将滤过泡分为4型。Ⅰ、Ⅱ型为功能性滤过泡,Ⅲ、Ⅳ型为非功能性滤过泡[4]。③在表麻下用Tonopen-XL眼压计测量兔眼双眼眼压,每眼测量3次,取其平均值。分别于术前及术后7 d内(隔日测量1次),以后每3天测量1次直至将动物处死,同时拍照记录滤过泡形态。

1.6 观察滤过道各指标变化

分别于术后7、14、28 d将空气注入兔耳缘静脉将其处死(每组3只)。取出右眼,剪取10 mm×10 mm结膜、结膜下组织及巩膜的块状组织(包括巩膜滤过道区域),置入4%多聚甲醛中固定(浸泡时间不超过12 h),石蜡包埋,连续切片,分别行HE染色、天狼星红染色及免疫组化染色。

1.6.1 HE染色 观察滤过道的炎症细胞情况,因炎症细胞量多,将病理切片中炎症细胞数量作等级资料处理(以下成纤维细胞和肌成纤维细胞亦做此处理),根据每高倍镜视野下炎性细胞的数量分为4个等级,0级<10个,+级10~50个,++级50~100个,+++级>100个。

1.6.2 天狼星红染色 通过偏光镜观察滤过道内Ⅰ、Ⅲ型新生胶原纤维的增殖情况。采用Image-pro plus 6.0图像分析软件,在每张切片上随机选取5个高倍视野,分别分析滤过道内新生胶原的染色面积占该空间面积的百分比。

1.6.3 免疫组化染色方法(SABC法) 采用鼠抗人波形蛋白(Vimentin)和鼠抗人α平滑肌肌动蛋白(α-SMA)免疫组化染色法,观察滤过道内成纤维细胞和肌成纤维细胞增殖情况,依据高倍镜视野下成纤维细胞和肌成纤维细胞的数量分为4级,0级无成纤维细胞,+级1~5个,++级6~10个,+++级>10个。

1.7 统计学处理

应用SPSS 11.5统计软件进行分析,数据以$\bar{x}\pm s$表示,双眼眼压数据采用单因素方差分析多重比较,离散分类计数资料或等级资料采用秩和检验(Nemenyi法)。

2 结果

2.1 临床观察

2.1.1 并发症情况 手术后术眼结膜充血、畏光、流泪、角膜水肿等眼部刺激症状3组间比较无明显差异。3组术眼均表现为轻度炎症反应,手术区结膜轻度充血,但恢复较快,3 d左右充血反应消失。在裂隙灯下观察发现角膜水肿3例(每组1例),浅前房2例(对照组和姜黄素组各1例),均未发现滤过泡渗漏、眼内炎、视网膜脱离等其他并发症。

2.1.2 滤过泡情况 各组在第3天和第7天均表现为功能性滤过泡;到第14天,各组功能性滤过泡个数分别为对照组3只,基质组3只,姜黄素组5只;第28天仅姜黄素组有2眼保留功能性滤过泡,其他均表现为非功能性滤过泡(图1)。

2.1.3 眼压变化 术前,术后1、3、28 d 3组眼压值差异不明显($P>0.05$),术后7、14、21 d 3组眼压值有明显差异($P<0.05$),见表1。

表1 术前及术后各时间点3组眼压值的比较(mmHg, $n=9$, $\bar{x}\pm s$)

组别	术前	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	13.89±1.17	7.56±1.33	7.89±1.45	10.44±1.13[a]	12.83±0.75[a]	13.33±1.15[a]	13.33±0.58
基质组	13.56±1.13	7.22±1.09	9.22±1.30	10.67±1.32[a]	12.67±0.82[a]	13.00±1.00[a]	13.00±1.00
姜黄素组	13.78±1.48	7.11±1.05	7.78±0.97	9.00±0.71	10.77±1.21	10.33±0.58	12.00±1.00

a: $P<0.05$,与姜黄素组比较

2.2 组织病理学改变

2.2.1 滤过道的炎性细胞　病理切片结果显示 3 组术后 7、14、28 d 各时间点均存在不同数量的炎性细胞，且术后 7 d 时姜黄素组与对照组和基质组比较有明显差异（$P<0.05$），但对照组与基质组间比较差异不明显（$P>0.05$）。而术后 14、28 d 3 组间比较差异无统计学意义（$P>0.05$，表 2）。

表 2　术后 7 d 各组炎性细胞数量的比较

组别	总切片（n）	炎性细胞量分级				平均秩次
		0	+	+ +	+ + +	
对照组[a]	9	1	4	3	1	16.67
基质组[b]	9	1	3	4	1	17.56
姜黄素组	9	7	1	1	0	7.78
总计	27	9	8	8	2	
秩次范围		1 – 9	10 – 17	18 – 25	26 – 27	
平均秩次		5	13.5	21.5	26.5	

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与姜黄素组比较

2.2.2 滤过道的成纤维细胞和肌成纤维细胞　滤过道病理切片结果显示 3 组术后滤过道均有不同程度的成纤维细胞和肌成纤维细胞增生，姜黄素组的成纤维细胞和肌成纤维细胞与对照组和基质组比较有显著差异（$P<0.05$，表 3、4）。

表 3　各组切片滤过道成纤维细胞数量比较

组别	总切片（n）	成纤维细胞量分级				平均秩次
		0	+	+ +	+ + +	
对照组[a]	27	0	2	15	10	46.06
基质组[a]	27	0	1	10	16	53.91
姜黄素组	27	0	15	9	3	23.04
总计	81	0	18	34	29	
秩次范围			1 – 18	19 – 52	53 – 81	
平均秩次			9.5	35.5	67	

a：$P<0.01$，与姜黄素组比较

表 4　各组切片滤过道肌成纤维细胞数量的比较

组别	总切片（n）	肌成纤维细胞量分级				平均秩次
		0	+	+ +	+ + +	
对照组[a]	27	0	13	8	6	45.56
基质组[a]	27	0	11	12	4	46.48
姜黄素组	27	6	13	6	2	30.96
总计	81	6	37	26	12	
秩次范围		1 – 6	7 – 43	44 – 69	70 – 81	
平均秩次		3.5	25	56.5	75.5	

a：$P<0.05$，与姜黄素组比较

2.2.3 滤过道新生胶原　依据胶原纤维所占面积百分比分级后，应用单因素方差分析进行统计，结果显示 3 组滤过道的Ⅰ型和Ⅲ型胶原均有不同程度的增生。姜黄素组与对照组和基质组之间的Ⅰ型胶原在 7、14、28 d 时有明显差异（$P<0.05$，表 5）。姜黄素组Ⅲ型胶原量虽在各个时间点略少于其他 2 组，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。

表 5　3 组Ⅰ型胶原量在术后不同时间点的比较（%，$n=9$，$\bar{x}\pm s$）

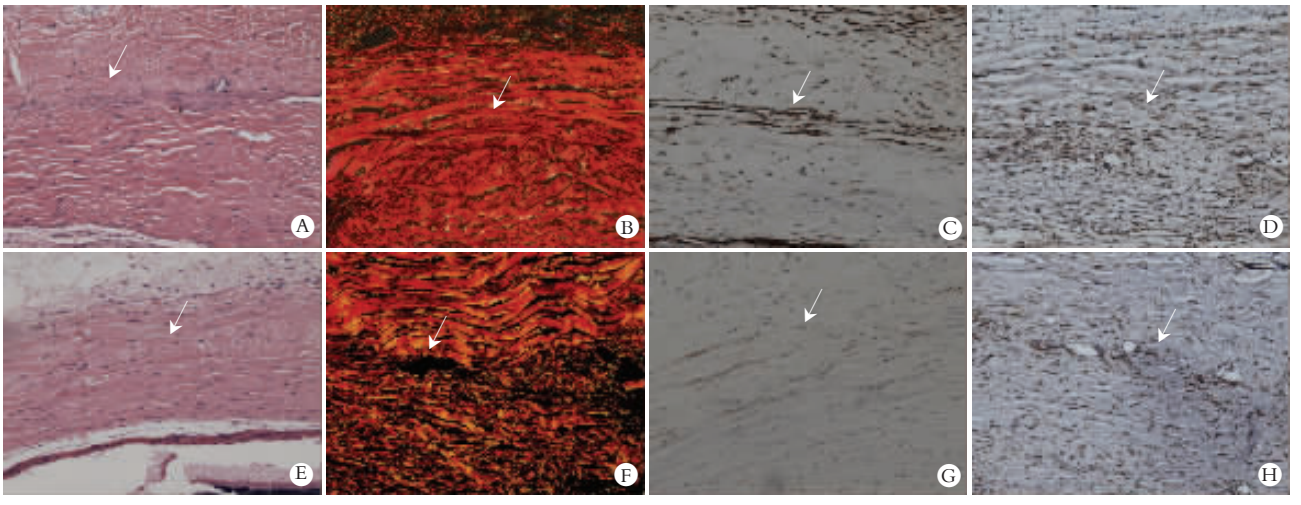
组别	7 d	14 d	28 d
对照组	29.71 ± 1.31[a]	36.83 ± 1.73[a]	47.13 ± 1.85[a]
基质组	31.07 ± 1.67[a]	38.09 ± 1.17[a]	48.13 ± 1.69[a]
姜黄素组	21.62 ± 2.87	27.83 ± 2.37	33.47 ± 2.79

a：$P<0.05$，与姜黄素组比较

3　讨论

青光眼滤过术后，由于血-房水屏障的破坏，早期炎症反应诱导炎症细胞浸润、各种细胞因子及生长因子产生，导致后期巩膜表层的 tenon’s 囊和球结膜下，巩膜下成纤维细胞的大量增殖和胶原纤维过度合成致使瘢痕形成，滤过道堵塞使手术失败。一般认为治疗瘢痕的任何非手术方法均应针对成纤维细胞增殖和调整胶原代谢异常这一关键环节。目前应用于临床的丝裂霉素和 5-氟尿嘧啶等抗代谢药物，是非选择的针对于细胞周期，虽可一定程度抑制成纤维细胞的增殖，但可能会损伤正常的角膜、结膜、视网膜细胞，会导致严重并发症。现虽也开发了大量的抗瘢痕药物及生物制剂，如环孢霉素 A，组织型纤融酶原激活剂，CAT-152[5]、Decorin[6]等，但大部分临床效果不佳或仍处于实验研究阶段。

姜黄素作为一种传统中药具有多种生物学功能，如抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗新生血管形成等而备受人



A～D：对照组滤过道染色结果；E～H：姜黄素组滤过道染色结果；A、E：HE 染色；B、F：天狼星红染色（红色为Ⅰ型胶原，绿色为Ⅲ型胶原）；C、G：肌成纤维细胞免疫组化染色（SABC）；D、H：成纤维细胞免疫组化染色（SABC）　↑：滤过道

图 1　对照组和姜黄素组术后 28 d 滤过道染色观察　（×200）

们的关注。近年来,在人们对它的进一步深入研究中发现它在肺,肝、肾、心脏[7]等部位具有强烈的抗纤维化作用,明显抑制肌成纤维细胞增殖,促使其凋亡,但对正常细胞却无明显毒副作用。目前姜黄素在眼科领域也有广泛的实验研究,如抑制翼状胬肉增生[8]、抑制新生血管形成[9]、预防白内障[10]和抑制晶状体上皮细胞增殖以及抑制视网膜色素上皮细胞增殖[11]等,但在青光眼方面尚少见有文献报道。本实验将姜黄素配置成眼膏用于青光眼术后的抗瘢痕化研究,首先是因为其本身是一种脂溶性的小分子药物,能通过细胞膜转入细胞内发挥生理功能。其次姜黄素是无毒的,已被广泛用作色素和食品添加剂,且有研究表明玻璃体内注射0.2 mg以下剂量的姜黄素不会对视网膜的功能和结构有影响,是安全的[12]。故将该药配置成眼膏用于本实验具有一定的可行性。而将其以眼膏形式用于术眼安全与否,虽从临床观察上未见明显的不良反应,但仍有待我们在进一步的实验中加以证实。

众所周知,青光眼术后的炎症反应会对术后瘢痕增生产生一定的影响。而有研究表明姜黄素具有抗急性、亚急性和慢性炎症的作用[13],其机制可能与皮质激素的参与有关,它作为有效地抗炎药已进入Ⅱ期临床试验阶段。从本实验结果观察,姜黄素组滤过道的炎性细胞浸润明显少于对照组和基质组,说明姜黄素可减轻术后早期炎症反应。研究表明姜黄素可以抑制成纤维细胞增生,减少胶原纤维分泌,抑制器官纤维化和瘢痕形成[2]。本实验亦发现,姜黄素组手术后滤过道的成纤维细胞和肌成纤维细胞明显少于对照组和基质组,其Ⅰ型胶原纤维量亦较其他2组新生Ⅰ型胶原纤维稀疏,并有明显的统计学意义($P<0.05$),但其Ⅲ型胶原虽较其余2组有所减少却无明显统计学意义。这可能是因为在正常兔眼巩膜组织中Ⅰ型胶原占绝大多数,Ⅲ型胶原在新生兔眼中仅占7%而到成年兔后几乎降至为零[14],而在本实验中所测得Ⅲ型胶原含量也甚少(仅有1% ~2%),且本实验样本量较少。此结果说明姜黄素有抑制成纤维细胞和肌成纤维细胞增生,减少胶原纤维分泌,阻止滤过道瘢痕化,维持滤过道通畅的功能。而对照组和基质组的炎性细胞、成纤维细胞,和Ⅰ型胶原纤维比较无明显差异,说明眼膏基质对炎性细胞浸润、成纤维细胞增生和胶原纤维分泌无明显影响($P>0.05$)。虽通过整个实验的病理切片结果可看出,姜黄素眼膏对青光眼术后的瘢痕增生有一定抑制作用,但从眼压和滤过泡的后期临床观察中发现,姜黄素组和对照组、基质组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。究其原因首先可能是我们采用的是正常眼压的动物模型,而并非青光眼模型,其次可能与药物浓度及药物半衰期有关,导致局部未能达到最佳有效浓度,致使虽然可以从微观的组织切片上见到一定疗效,但在临床观察指标中未见明显效果。

本实验是关于姜黄素对于青光眼术后滤过道瘢痕的初步研究,我们发现姜黄素对瘢痕有一定抑制作用,但此实验尚存在一些不足。比如姜黄素的制剂改进,药代动力学,给药时间以及姜黄素对瘢痕的作用机制也是本研究尚待解决的问题。

参考文献:

[1] 李剑明, 杨和平. 姜黄色素抗肿瘤作用研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(15): 1410 - 1411.

[2] Venkatesan N D, Punithavathi D, Babu M. Protection from acute and chronic lung diseases by curcumin[J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 595: 379 - 405.

[3] 于冬青, 邓华聪. 姜黄素的药理作用研究进展[J]. 山东医药, 2005, 45(2): 72 - 73.

[4] 张舒心, 刘磊. 青光眼治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 181 - 196.

[5] Khaw P, Grehn F, Hollo G, *et al*. A phase III study of subconjunctival human anti-transforming growth factor beta(2) monoclonal antibody (CAT-152) to prevent scarring after first-time trabeculectomy[J]. Ophthalmology, 2007, 114(10): 1822 - 1830.

[6] Grisanti S, Szurman P, Warga M, *et al*. Decorin modulates wound healing in experimental glaucoma filtration surgery: a pilot study[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(1): 191 - 196.

[7] Li H L, Liu C, de-Couto G, *et al*. Curcumin prevents and reverses murine cardiac hypertrophy[J]. J Clin Invest, 2008, 118(3): 879 - 893.

[8] 边芳, 张名昌. 姜黄素抑制翼状胬肉成纤维细胞增生的研究[J]. 临床眼科杂志, 2005, 13(3): 198 - 201.

[9] Mrudula T, Suryanarayana P, Srinivas P N, *et al*. Effect of curcumin on hyperglycemia-induced vascular endothelial growth factor expression in streptozotocin-induced diabetic rat retina[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361(2): 528 - 532.

[10] Kumar P A, Suryanarayana P, Reddy P Y, *et al*. Modulation of alpha-crystallin chaperone activity in diabetic rat lens by curcumin[J]. Mol Vis, 2005, 11: 561 - 568.

[11] 龚凌, 姜德咏, 朱晓华, 等. 姜黄素对培养的人胚胎视网膜色素上皮细胞增殖活性的影响[J]. 眼科学报, 2004, 20(4): 246 - 248, 258.

[12] 安建斌, 马景学, 刘丹岩, 等. 姜黄素兔眼玻璃体内注射对视网膜功能和结构的影响[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1590 - 1593.

[13] 鲍华英, 陈荣华. 姜黄素的研究进展[J]. 国外医学: 儿科学分册, 2003, 30(5): 254 - 256.

[14] Lee R E, Davison P F. Collagen composition and turnover in ocular tissues of the rabbit[J]. Exp Eye Res, 1981, 32(6): 737 - 745.

(**收稿**:2010-01-07;**修回**:2010-02-25)

(编辑 张 维)