重庆维普 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2008)09-1088-04

玻璃体腔注射曲安奈德治疗兔视网膜水肿的实验研究

胡晓鹏,倪寿翔,李 立,周希瑗

(重庆医科大学附属第二医院眼科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨常规剂量国产曲安奈德(Triamcinolone acetonide,TA)玻璃体腔注射治疗兔视网膜水肿的作用机制。方法:将健康新西兰大白兔 48 只随机分为 A、B 两组,均对右眼采用氩激光直接光凝法封闭视网膜静脉建立视网膜水肿的模型。A 组 24 只兔右眼不做任何处理作为对照组,B 组 24 只兔右眼在建模后 1d 玻璃体腔注射 TA 4mg/0.1ml 作为实验组,A 组和 B 组分别于注药后 3d、1 周、2 周及 1 月各时间点随机处死 6 只动物,光镜下观察视网膜各层结构变化,利用原位杂交法检测各组兔视网膜组织中 VEGF mRNA 的表达,免疫组化法检测 IL-6 的表达情况。结果:48 只兔均成功建立兔视网膜水肿模型,光镜下 TA 实验组视网膜组织形态改变优于对照组,实验组兔视网膜组织中 VEGF mRNA 以及 IL-6 的表达明显低于对照组,差异有显著性意义($P<0.05$)。结论:TA 能够有效降低视网膜水肿后 VEGF 及 IL-6 在视网膜组织中的表达,减轻视网膜的水肿,保护视网膜。

【关键词】曲安奈德;视网膜静脉阻塞;药物治疗

【中国图书分类法分类号】R969.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-10

Experimental study on intravitreous injection with domestic triamcinolone acetonide for retinal edema in rabbits

HU Xiao-peng, et al

(Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mechanism of intravitreous injection with conventional dosage of domestic triamcinolone acetonide (TA)for retinal edema in rabbits. *Methods*: The model of retinal edema was established with argon laser photocoagulation to retinal vein in fourty-eight healthy purebred New Zealand white rabbits. The right eye of A group wasn't injected anything as the control group, and the right eye of B group was injected with TA suspension 4mg(0.1ml)as the TA group. Six animals were killed randomly 3 days, 1 week, 2 weeks, and 1 month after the injected. The changes of the retinal edema were observed by light microscopy. The expression of VEGF mRNA and IL-6 were observed respectively by hybridization in situ and immunohistochemical method. *Results*: The model of retinal edema was established in all the eyes. The pathologic changes in TA group were better than that in control group. The expressions of VEGF mRNA and IL-6 in control group were higher than in TA group ($P<0.05$). *Conclusion*: Intravitreous injection of domestic TA may low the expression of VEGF mRNA and IL-6 in the model of retinal edema effectively and protect the retina.

【Key words】 Triamcinolone acetonide; Retinal vein occlusion; Medical treatment

视网膜水肿,尤其是黄斑部的视网膜水肿可见于多种眼底病变,如:视网膜静脉阻塞(Retinal vein occlusion,RVO),糖尿病性视网膜病变(Diabetic retinopathy,DR),葡萄膜炎,眼外伤,白内障手术后的黄斑水肿等[1],其中以 RVO 最常见。以往黄斑水肿的治疗方法主要是黄斑部格栅样激光光凝,但其疗效并不令人满意。近年来研究人员在临床应用中发现通过玻璃体腔注射 TA 对于治疗各种原因所致的难治性黄斑水肿中有明显的疗效[2]。血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)是近年来确定的一种具有自分泌和旁分泌机制的生长因子,具有显著的促血管内皮细胞增殖和血管渗漏作用[3]。白介素 -6(Interlukin-6,IL-6)是多功能的炎症细胞因子,所诱导的炎症反应通常伴有血眼屏障和血视网膜屏障的破坏,IL-6 可能通过诱导 VEGF 表

作者介绍: 胡晓鹏(1973-),男,主治医师,硕士,研究方向:玻璃体视网膜疾病。

基金项目: 重庆医科大学启动基金(0200100313)。

重庆维普 http://www.cqvip.com

达而间接诱导血管渗漏发生[4]。本实验尝试用国产TA 4mg/0.1ml 玻璃体腔内注射，治疗兔 RVO 后所致的视网膜水肿，检测视网膜组织中 VEGF及 IL-6 的表达，观察其干预视网膜水肿的效果，初步探讨其治疗视网膜水肿的作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备

健康新西兰大白兔 48 只（重庆医科大学实验动物中心提供），雌雄不限，体重＞2kg，裂隙灯显微镜下观察眼部检查无异常。将 48 只兔散瞳麻醉后，耳缘静脉注入 10%荧光素钠(0.1ml/kg)，通过荧光素眼底血管造影(FFA)明确定位视网膜静脉主干。在裂隙灯加间接全视网膜镜的引导下，对右眼作氩激光光凝(光斑直径 50μm，功率 300mW，时间 0.2s)。在视盘两侧 1 个视盘直径(DD)范围内动静脉分离较开处，完全封闭视盘两侧的静脉主干(血管光凝长度约 1/2DD)，激光光凝 24h 后复行 FFA 验证，对视网膜静脉未完全阻断者补充光凝确保完全阻断。

1.2 分组及用药方案

将 48 只兔随机分为 A、B 2 组，A 组 24 只兔右眼不做任何处理为对照组，B 组 24 只兔右眼玻璃体腔注射 TA 4mg/0.1ml（昆明积大制药有限公司）作为实验组，于成模后第 1 天开始注药，在动物麻醉后，显微镜下 4 号针头前房穿刺，抽取房水 0.1ml，防止眼内压过高药物溢出，角膜缘后约 4mm 处经巩膜穿刺行玻璃体腔注射。

1.3 取材

A、B 二组分别于注药后 3d、1 周、2 周及 1 月时间点随机处死 6 只兔子，摘除眼球，参照马进等[5]的方法，均在显微镜下沿视盘上下各 3mm，平行于视盘两侧血管主干的走行方向，将眼球剖切取材，制作视网膜病理切片。

1.4 组织学检查

切取的视网膜标本置于中性甲醛中固定 24h 后取出，常规脱水，石蜡包埋，连续切片，苏木精－伊红染色，光镜下观察全层视网膜异常结构改变，对光凝部位不作观察。

1.5 VEGF mRNA 及 IL-6 含量检测

组织原位杂交方法测定视网膜组织中 VEGF mRNA（检测试剂盒购自武汉博士德生物有限公司）的表达，免疫组化方法检测 IL-6（购自 Santa Cruz 公司）的表达，操作按照试剂盒说明步骤操作。分别随机选取各时间点每组 10 张组织切片，每张切片随机选取视网膜内层 2 个视野（×400），图像分析系统进行分析，以阳性表达面积与测定视野面积的比值来表示表达水平。

1.6 统计学处理

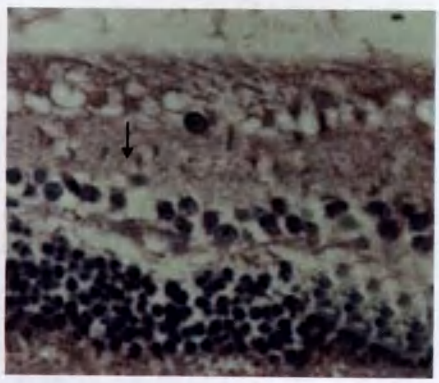
所有检测结果以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用SPSS12.0 统计软件进行方差分析及 t 检验，以 $P<0.05$ 为有显著性统计学差异。

2 结 果

2.1 光镜观察

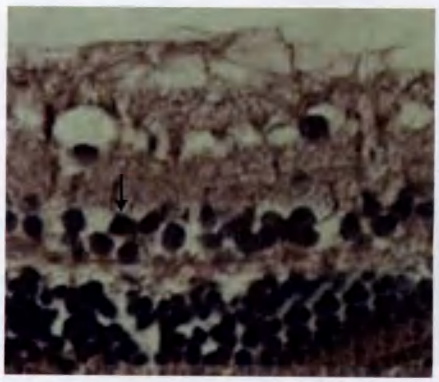
光镜下正常视网膜层次结构清楚，光感受器内外节排列整齐，颗粒层细胞排列紧密。造模后 3d时，对照组视网膜各层结构不清，排列紊乱，节细胞数目减少，空泡样变，视锥、视杆细胞疏密不一，细胞水肿，1 周及 2 周时与 3d 时比较未见明显变化（图1）。实验组造模后 3d 时视网膜结构不清，视网膜色素上皮细胞排列失去正常连贯性，节细胞可见空泡样变，1 周时视网膜结构紊乱，节细胞稍有空泡样变，2 周时视网膜结构层次清晰，明显优于对照组（图2）。1 月时两组视网膜组织均有所恢复，实验组视网膜组织已经接近于正常组织，明显优于对照组。

2.2 VEGF mRNA 的表达



神经节细胞层结构疏松，内核层细胞数量减少，细胞水肿（箭头） HE×400

图 1 对照组 2 周兔眼视网膜光学显微镜像



视网膜各层组织结构清晰，可见内核层不同程度的细胞数量的减少（箭头） HE×400

图 2 实验组 2 周兔眼视网膜光学显微镜像

重庆维普 http://www.cqvip.com

表 1 TA 对兔视网膜 VEGF mRNA 表达的影响（$\bar{\chi} \pm s$）

组别	不同时间兔视网膜 IL-6 的表达				F	P
	3d	1 周	2 周	1 月		
对照组	0.206 8 ± 0.010 4	0.247 0 ± 0.009 7	0.284 7 ± 0.013 8	0.234 4 ± 0.021 4	62.22	0.000 1
实验组	0.187 5 ± 0.015 5	0.150 7 ± 0.012 1[b]	0.111 6 ± 0.018 7[b]	0.063 9 ± 0.010 5[b]	970.87	0.000 1

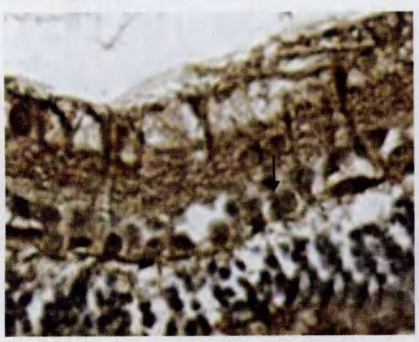
[b]$P<0.05$，与对照组比较

表 2 TV 对兔视网膜 IL-6 表达的影响（$\bar{\chi} \pm s$）

组别	不同时间兔视网膜 IL-6 的表达				F	P
	3d	1 周	2 周	1 月		
对照组	0.176 9 ± 0.010 0	0.160 1 ± 0.009 6	0.134 8 ± 0.008 9	0.089 6 ± 0.011 5	488.82	0.000
实验组	0.143 9 ± 0.009 5[b]	0.097 4 ± 0.009 2[b]	0.068 9 ± 0.011 4[b]	0.037 9 ± 0.010 0	317.16	0.000

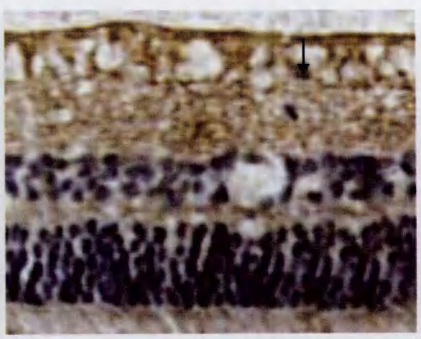
[b]$P<0.05$，与对照组比较

VEGF 原位杂交结果显示：正常视网膜 VEGFmRNA 呈弱阳性表达，3d、1 周和 2 周时对照组视网膜细胞胞浆呈棕褐色，VEGF mRNA 均呈强阳性表达（图3），较实验组强，实验组表达较弱（图 4）。1 月时对照组 VEGF mRNA 表达减弱，但较实验组强，实验组呈弱阳性表达（图 5）。VEGF mRNA 图像分析表达水平的比较（表 1），各时间点实验组表达水平明显减低，与对照组比较差异有显著性意义（$P<0.05$）。这说明TA



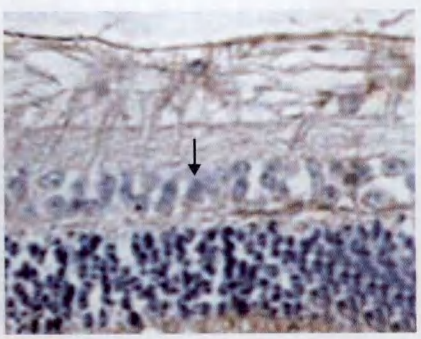
VEGF 主要在视网膜内核层和神经纤维层表达（箭头） ×400

图 3 对照组 1 周兔眼视网膜 VEGF 原位杂交染色像



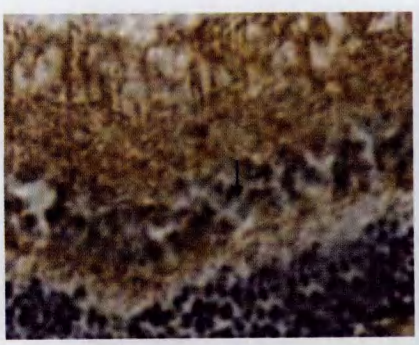
VEGF 在神经纤维层弱阳性表达（箭头） ×400

图 4 实验组 1 周兔眼视网膜 VEGF 原位杂交染色像



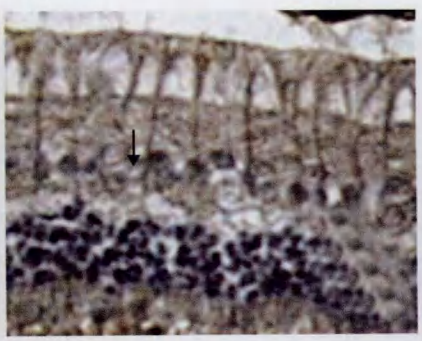
VEGF 在视网膜内核层和神经纤维层几乎无表达（箭头） ×400

图 5 实验组 1 月兔眼视网膜 VEGF 原位杂交染色像



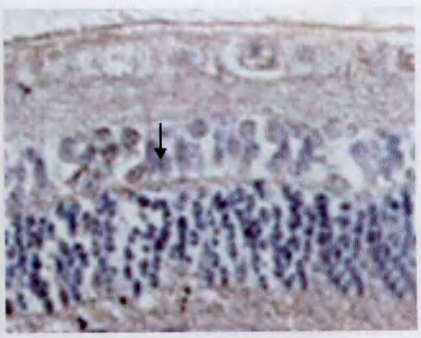
细胞胞浆呈棕褐色，IL-6 主要在视网膜内核层和神经纤维层表达（箭头） ×400

图 6 对照组 1 周兔眼视网膜 IL-6 免疫组化染色像



IL-6 在视网膜内核层和神经纤维层弱阳性表达（箭头） ×400

图 7 实验组 1 周兔眼视网膜 IL-6 免疫组化染色像



IL-6 在视网膜内核层弱阳性表达（箭头） ×400

图 8 实验组 1 月兔眼视网膜 IL-6 免疫组化染色像

重庆维普 http://www.cqvip.com

可减少 VEGF mRNA 的表达。

2.3 IL-6 的表达

IL-6 免疫组织化学结果：正常视网膜 IL-6 几乎无表达，3d 及 1 周时对照组，视网膜细胞胞浆染色呈棕褐色，IL-6 呈强阳性表达(图 6)，明显较实验组强(图 7)；2 周时两组表达均减弱，但对照组仍表达较强，实验组表达呈弱阳性(图 8)；1 月时各组均呈弱阳性表达接近正常视网膜表达。图像分析表达水平的比较(表 2)：3d、1 周和 2 周时实验组表达明显减少，与对照组比较差异具有显著性意义($P<0.05$)，1 月时两组比较则无差异。这说明 TA 可减少 IL-6 的表达。

2.3 IL-6 的表达

IL-6 免疫组织化学结果：正常视网膜 IL-6 几乎无表达，3d 及 1 周时对照组，视网膜细胞胞浆染色呈棕褐色，IL-6 呈强阳性表达(图 6)，明显较实验组强(图 7)；2 周时两组表达均减弱，但对照组仍表达较强，实验组表达呈弱阳性(图 8)；1 月时各组均呈弱阳性表达接近正常视网膜表达。图像分析表达水平的比较(表 2)：3d、1 周和 2 周时实验组表达明显减少，与对照组比较差异具有显著性意义($P<0.05$)，1 月时两组比较则无差异。这说明 TA 可减少 IL-6 的表达。

3 讨 论

视网膜水肿主要与血－视网膜屏障(Blood-retina barrier，BRB)破坏有关。正常情况下该屏障可通过主动和被动转运过程防止血浆成分自由进入视网膜，对维持视网膜内光感受器的自身稳定性起重要作用。一旦因各种诱因使该屏障遭到破坏，将不能严格控制血浆蛋白和水分进入视网膜实质层，导致视网膜细胞外间隙明显扩张，在黄斑区就表现为视网膜内核层和外从状层液体的积聚以及视网膜增厚[6]。BRB 破坏的确切机制尚不明了，可能是由于由视网膜或玻璃体因子产生的紧密连接中的角蛋白被破坏，毛细血管内皮细胞、色素上皮细胞的经内皮血管转运功能失常，改变了视网膜血管的渗透性，从而导致水、电解质的消极渗漏和视网膜的增厚。BRB破坏与致血管渗漏因子的表达有关。主要有 VEGF 和 IL-6 等。

本实验通过氩激光直接光凝法封闭兔眼视网膜静脉建立视网膜水肿的模型，采用 TA 4mg/0.1ml 玻璃体腔注射，对视网膜水肿进行结构观察，并且检测视网膜组织中 VEGF 及 IL-6 的表达，结果发现，TA 能够明显降低视网膜水肿程度，TA 实验组视网膜组织中 VEGF 及 IL-6 的表达明显低于对照组，差别具有统计学意义。VEGF 是近年来确定的一种具有自分泌和旁分泌机制的生长因子，具有显著的促血管内皮细胞增殖和血管渗漏作用。VEGF 可能通过以下两种机制发挥促血管渗漏作用：①破坏细胞间紧密连接。Antonetti 等[7]发现 VEGF 能改变血管内皮细胞紧密连接蛋白 Occludin 的分布并使其发生结构改变，在牛视网膜血管内皮细胞的培养基中分别加入 12nmol/L VEGF，仅6h后 Occludin 的表达就分别下降了 54%。②细胞吞饮作用。Hofman 等[3]将 VEGF 注射入猴眼中，经荧光血管造影检查发现有显著的血管渗漏，同时在发生渗漏的血管内皮细胞基底膜处发现有大量吞饮小泡形成，这提示血液成分渗漏是通过跨细胞吞饮作用而实现的。IL-6 是多功能的炎症细胞因子，所诱导的炎症反应通常伴有血眼屏障和 BRB 的破坏。Shimizu E 等[8]发现糖尿病性视网膜水肿患者房水中 IL-6 的表达显著增强。IL-6 和VEGF 表达之间还存在相关性，IL-6 可能通过诱导 VEGF 表达而间接诱导血管渗漏发生。有研究显示血浆IL-6 水平与糖尿病性视网膜水肿发生存在密切相关性，可作为糖尿病性视网膜水肿发生的预示因素。

TA 又名丙羟基泼尼松龙、曲安缩松、去炎松 A，是人工合成的一种含氟长效糖皮质激素，呈白色或类白色结晶状粉末。该药微溶于乙醇和氯仿，难溶于水。药物作用半衰期为 5h，其难溶于水的特性使其在局部用药时吸收缓慢，作用可维持 2～3 周甚至更长时间。近年来研究人员在临床应用中发现通过玻璃体腔注射 TA 对于治疗各种原因所致的难治性黄斑水肿中有明显的疗效。Martidis 等[9]对光凝治疗无效的糖尿病性黄斑水肿患者眼内注射 TA 治疗，结果显示黄斑水肿明显减退，患者视力明显提高。Jonas 等[10]对于 DR 弥漫性黄斑水肿患者进行眼内注射 TA 治疗，并将其疗效与传统激光治疗比较，注药组视力进步明显，而激光治疗组视力无明显改善，二者比较差异有显著性意义。Ebrahem 等[11]研究认为 TA 可以降低角膜新生血管组织中 VEGF 及 IL-6 的表达，我们研究认为 TA 是通过降低视网膜组织中 VEGF 及 IL-6 的表达治疗视网膜水肿，Tong 等[12]研究认为TA 通过降低视网膜组织中 VEGF 的表达来预防新生

(下转第 1107 页)

重庆维普 http://www.cqvip.com

学基础,我们在行为学观察上发现,B 组(胰岛素组)的 BBB 评分要好于 A 组(损伤对照组)。

总之,脊髓损伤后,由于胰岛素能抑制细胞凋亡、促进神经轴突的修复和再生,给与胰岛素治疗,的确能起到一定的神经保护作用,有利于脊髓损伤后功能的恢复,而且,胰岛素相对于其他神经营养及保护药而言,价格便宜,用药方便,这为临床治疗脊髓损伤又开辟出一条新的治疗途径。

参 考 文 献

[1] Recio-Dinto E,Ishii DN. Insulin and insulin like growth factor receptors regulating neurite formation in cultured human neuroblastoma cells[J]. Neurosic Res,1988;19(3):312-320.

[2] Fernyhough P,Willars GB,Lindasy RM,et al. Insulin and insulin-like growth factor Ⅰ enhance regeneration in cultured adult rat sensory neurons[J]. Brain Research,1993;607(6):117-124.

[3] LI GL,Farooque M,Olsson Y,et al. Changes of Fas ang Fas ligang immunoreactivity after compression trauma to rat spinal cord [J]. Acta Neuropathol(Ber),2000;100(8):75-81.

[4] Gao F,Gao E,Yue TL,et al. Nitric oxide mediates the anti-apoptotic effect of indulin in myocardial ischemia-reperfusion the roles of PI3-kinase,AKT,and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation[J]. Circulation,2002;105(12):1497-1502.

[5] Rizk NN,Rafols JA,Dunbar JC. Cerebral ischemia-induced apoptisis and necrosis in normal and diabetic rat effects of insulin and c-peptide[J]. Brain Research,2006;1096(1):204-212.

[6] Khokhlatchev AV,Canagarajah B,Wilsbacher J,et al. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation[J]. Cell,1998;93(4):605-615.

[7] Robey RB,Hav N. Mitochondrial hexokinases,novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt[J]. Oncoqene,2006;25(34):4683-4696.

[8] Winnay JN,Bruning JC,Burks DJ,et al. Gab-1-mediated IGF-I signaling in IRS-1-deficient 3T3 fibroblasts[J]. Biol Chem,2000;275(14):10545-10550.

[9] Recio-Pinto E,Ishii DN. Effects of insulin,insulin-like growth factor-II and nerve growth factor on neurite outgrowth in cultured human neuroblastoma cells[J]. Brain Res,1984;302(2):323-334.

[10] Wang XY,Zhang JT. Effects of ginsenoside Rgl on synaptic plasticity of freely moving rats and its mechanism of action[J]. Acta Phamacol Sin,2003;22(1):657-662.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 1091 页)

血管的形成和黄斑水肿,这与我们的结果基本一致。虽然我们初步证实 TA 可能通过降低视网膜组织中 VEGF 及 IL-6 的表达从而减轻视网膜水肿程度,但是否存在与其它协同因子的相互作用尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] T ranos PG,Wickremasinghe SS,Stangos NT, et al. Macular edema[J].Survey of Ophthalmology,2004;49(5):470-490.

[2] Dubey AK. Intravitreal injection of triamcinolone acetonide for diabetic macular edema: principles and practice[J]. Indian Journal of Ophthalmology,2006;54(4):290-291.

[3] Hofman P,Blaauwgeers HG,Tolentino MJ,et al. VEGF-A induced hyperpermeability of blood-retinal barrier endothelium in vivo is predominantly associated with pinocytotic vesicular transport and not with formation of fenestrations. Vascular endothelial growth factor-A [J].Current Eye Research,2000;21(2):637-645.

[4] Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR, et al. Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2000;41(5):1153-1158.

[5] 马 进,吴德正,高汝龙,等. 兔视网膜细胞间水肿及玻璃体收缩性状改变的相关研究[J].中华眼底病杂志,2004;20(1):29-32.

[6] Dick JS. Macular edema[J]. Int Ophthalmol Clin,1999;39(4):1-18.

[7] Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, et al. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occluding content:vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells[J]. Diadetes,1998;47(12):1953-1959.

[8] Shimizu E, Funatsu H, Yamashita H. Plasma level of interleukin-6 is an indicator for predicting diabetic macular edema[J]. Jan J Ophthalmol,2002;46(1):78-83.

[9] Martidis A, Duker JS, Greenberg PB, et al. Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema[J].Ophthalmology,2002;109(5):920-927.

[10] Jonas JB, Kreissig I, Sofker A, et al. Intravitreal injection of triamcinolone for diffuse diabetic macular edema[J]. Arch Ophthalmol,2003;121(1):57-61.

[11] Ebrahem Q, Minamoto A, Hoppe G, et al. Triamcinolone acetonide inhibits IL-6 and VEGF induced angiogenesis downstream of the IL-6 and VEGF receptors [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2006;47(11):4935-4941.

[12] Tong JP,Lam DS,Chan WM,et al. Effects of triamcinolone on the expression of VEGF and PEDFin human retinal pigment epithelial and human umbilical vein endothelial cells[J]. Molecular vision,2006;12(4):1490-1495.

(责任编辑:谭乐勤)