维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)12-1252-04

兔眼玻璃体腔注射国产曲安奈德的视网膜毒性研究

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:研究常规剂量国产曲安奈德(Triamcinolone Acetonide,TA)玻璃体腔内注射对兔视网膜的毒性作用。方法:纯种健康新西兰大白兔 48 只行玻璃体腔内注射,随机选取 24 只兔子右眼注射生理盐水 0.1ml 作为对照 A 组,该 24 只兔子左眼注射 TA 混悬液 4mg/0.1ml 作为试验 B 组,其余 24 只兔子右眼注射去赋形剂的 TA0.1ml(去除的赋形剂用生理盐水补足)作为试验 C 组,其左眼注射从曲安奈德混悬液中分离的赋形剂 0.1ml 作为试验 D 组。每只动物于注药前及注药后 3 天、2 周及 1 月各时间点行双眼 FERG 检查,检查后处死动物,取出眼球行视网膜光学及电子显微镜检查,观察其结构的改变。结果:各实验组兔眼注药前后 FERG b 波潜伏期无明显变化,在注药后短时间内有 b 波振幅的降低,差异具有统计学意义($P < 0.001$);赋形剂组在注药后 1 月还有 b 波振幅的降低,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。光学及电子显微镜观察,赋形剂组在注药后各时间点均有视网膜结构的改变,去赋形剂组以及 TA 混悬液组只在短时间内有视网膜结构的改变。结论:4mg 国产 TA 兔眼玻璃体腔注射短期内可引起视网膜结构和功能的轻度改变,但这种改变只是暂时性和可逆的,其对视网膜的毒性作用可能主要是由赋形剂引起的。

【关键词】曲安奈德/毒性;曲安奈德/治疗应用;视网膜;超微结构

【中国图书分类法分类号】R969.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-14

Study of toxicity of intravitreous injection with domestic triamcinolone acetonide on rabbits retina

HU Xiaopeng, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To investigate the toxicity effect of intravitreous injection with conventional dosage of domestic triamcinolone acetonide (TA) on rabbits retina. *Methods*: Forty-eight healthy purebred New Zealand white rabbits underwent intravitreous injection. The right eye of the 24 animals was injected with sterile saline solution 0.1ml as the control A group; and the left eye was injected with TA suspension 4mg (0.1ml) as the B experimental group; The right eye of the other 24 animals was injected with TA 0.1ml without excipient as the C experimental group, the excipient removed was supplemented with terile saline solution; and the left eye was injected with excipient 0.1ml separated from TA suspension as the D experimental group. Flash electroretinography (FERG) was performed on each animal before intravitreous injection, 3 days, 2 weeks, and 1 months after the injected. After the examination the animal was killed and the eyeballs were extirpated at the three points of time after the injected. The ultrastructural changes of the retina were observed by light and electron microscopy. *Results*: No significant difference was found in the latent period of b-wave of FERG before and after the injected, but the amplitudes of b-wave of FERG was lower in all the groups than that before the treatment in a short time after the injected ($P < 0.001$). The amplitudes of b-wave of FERG was still lower in the excipient group 1 month after the injected ($P < 0.001$). The results of light and electron microscopy showed the ultrastructural changes of the retina in the excipient group at all the three points of time after the injected, only short-time ultrastructural changes in the other groups. *Conclusion*: Intravitreous injection of domestic TA with the dosage of 4mg may make the ultrastructure changes and function of retina in short term, but the changes are temporal and reversible, and may mainly come from the excipient.

【Key Words】 Triamcinolone Acetonide/therapeutic use; Triamcinolone Acetonide/toxicity; Retina; ultrastructure

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

基金项目:重庆医科大学启动基金(0200100313)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

曲安奈德（Triamcinolone Acetonide,TA）作为一种长效的糖皮质激素越来越多地应用于眼科临床治疗中，以玻璃体腔注射的给药方式治疗多种原因引起的黄斑水肿，减轻炎症反应、抑制增生性玻璃体视网膜病变（PVR）的发生和减少眼内新生血管的形成[1]。随着 TA 玻璃体腔注射在临床的广泛应用，其引起的各种并发症及副作用如眼压升高、白内障、眼内炎、出血、视网膜脱离和视网膜毒性反应等越来越引起人们的重视[2-6]，其中对视网膜是否存在毒性反应是目前最令人关注的问题。我们研究了常规剂量（4mg）国产 TA 玻璃体腔注射对视网膜超微结构的影响，希望对 TA 的临床应用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验分组与检测方法

曲安奈德注射液（昆明积大制药有限公司），规格 40mg/ml。TA 离心（离心半径 5cm，3000r/min 离心 5min）去除上清夜，加入等量生理盐水，充分混匀后再次离心，以去除赋形剂成分[7]。健康纯种新西兰大白兔 48 只，雌雄不限，体重 2.5~3kg，实验前常规双眼前后节检查均无异常。随机选取 24 只兔子右眼玻璃体腔内注射生理盐水 0.1ml 作为对照 A 组，该 24 只兔子左眼注射 TA 混悬液 4mg/0.1ml 作为试验 B 组，其余 24 只兔子右眼注射去赋形剂的 TA 0.1ml（去除的赋形剂用生理盐水补足）作为试验 C 组，其左眼注射从曲安奈德混悬液中分离的赋形剂 0.1ml 作为试验 D 组。每只动物于注药前均进行闪光视网膜电图（FERG）检查。测试前需散瞳暗适应 30min，角膜接触电极置于角膜表面，参考电极与地电极分别固定于额正中，耳缘皮肤表面。采用重庆泰克公司 TEC-350T 视觉电生理检查系统，测定条件：固视灯，单次标准白光刺激，刺激次数 5 次，放大倍数 5000，刺激频率 低频：0.1Hz，高频：0.075kHz，时间坐标：25ms/d，每只眼测 3 次，记录平均值。3%的戊巴比妥钠按 1ml/kg 的剂量经兔耳缘静脉注射麻醉动物后，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，角膜缘后方约 4mm 处行玻璃体腔注射。分别于注药后 3 天、2 周及 1 月从两组动物中随机选择 8 只兔进行闪光视网膜电图（FERG）检查，检查完毕后用 2.5%戊二醛灌流固定后摘取眼球，取离注射部位最近的赤道部视网膜，常规制作光学显微镜及电子显微镜标本。其中内核层细胞记数方法：我们采用将组织切片置光学显微镜下观察，在高倍（10×40）下，随机选取 10 个视野进行内核层细胞记数，取其平均值比较。

1.2 统计方法

用统计学软件 SAS8.2 进行方差分析 Dunnett's t Tests。

2 结 果

2.1 视网膜电图结果

FERG 结果显示：各实验组 b 波潜伏期在注药前后差异无统计学意义（$P>0.05$），其改变主要集中在振幅的变化（表 1）。各实验组组内 b 波振幅总的来说都有差别：$F_A=32.54$，$P<0.001$；$F_B=87.16$，$P<0.001$；$F_C=114.24$，$P<0.001$；$F_D=96.32$，$P<0.001$。实验各组在用药后 3 天、2 周与用药前相比差别均有统计学意义（$P<0.005$），但实验 A、B、C 组在用药后一个与用药前相比差别无统计学意义（$P>0.05$），而实验 D 组与用药前相比差异具有统计学意义。各实验组组间进行比较，总的来说差别具有统计学意义（$F=25.08$，$P<0.05$），实验 B、C 组与对照 A 组相比差异无统计学意义（$P>0.05$），实验 D 组与对照 A 组相比差异具有统计学意义（$P<0.005$）。综上，用药 3 天、2 周时各组 FERG b 波振幅的降低与用药前相比均有降低（各组 $P<0.005$），但 A、B、C 组在用药后 1 月恢复正常，D 组用药后 1 月与用药前相比降低明显。赋形剂组与生理盐水组比较 FERG b 波振幅降低明显。

2.2 光学显微镜观察结果

实验各组用药后 3 天见视网膜内核层细胞数量减少，细胞轻度水肿，神经节细胞层结构疏松，以赋形剂组尤为明显（图 1）；用药后 2 周 A、B、C 组视网膜内核层细胞稍有减少（图 2），其余组织结构基本正常；而到 1 个月时赋形剂组视网膜结构的改变仍未恢复。



神经节细胞层结构疏松，内核层细胞数量减少，细胞轻度水肿（白箭） HE×400

图 1 实验 D 组用药后 3 天兔眼视网膜光学显微镜像



视网膜各层组织结构尚可，排列整齐，可见内核层细胞数量稍有减少（白箭） HE×400

图 2 实验 C 组用药后 2 周兔眼视网膜光学显微镜像

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 FERG b 波振幅用药前后的平均值($\bar{x} \pm s$,uv)

组别	用药前	用药后 3 天	用药后 2 周	用药后 1 月	F	P
A 组	140.04 ± 11.12	90.04 ± 11.23	125.34 ± 8.92	133.16 ± 11.76	32.54	<0.001
B 组	138.82 ± 11.32	57.30 ± 7.58	85.90 ± 6.06	131.13 ± 12.67	87.16	<0.001
C 组	141.05 ± 12.25	74.15 ± 7.02	93.20 ± 7.61	130.80 ± 9.64	114.24	<0.001
D 组	139.46 ± 11.18	40.21 ± 6.25	75.18 ± 7.59	101.56 ± 8.56	96.32	<0.001



图 3 实验 D 组用药后 3 天兔眼视网膜电子显微镜像。视网膜层次结构紊乱,光感受器细胞核核周间隙增宽(白箭),内质网扩张(黑箭头) Ua-Lc×6000

图 4 实验 D 组用药后 3 天兔眼视网膜电子显微镜像。线粒体出现肿胀、空泡样变性,部分线粒体嵴消失(黑箭头);膜盘结构肿胀、扭曲变形(白箭) Ua-Lc×20000

图 5 实验 C 组用药后 3 天兔眼视网膜电子显微镜像。内质网扩张,空泡样变性(白箭) Ua-Lc×6000



图 6 实验 D 组用药后 2 周兔眼视网膜电子显微镜像。视网膜组织层次结构紊乱,部分线粒体肿胀,线粒体嵴消失(白箭) Ua-Lc×20000

图 7 实验 C 组用药后 2 周兔眼视网膜电子显微镜像。视网膜层次结构清晰,线粒体无肿胀,线粒体嵴清晰完整,无断裂(白箭) Ua-Lc×20000

图 8 实验 D 组用药后 1 月电子显微镜像。线粒体结构基本正常,膜盘扭曲变形,甚至出现断裂(白箭) Ua-Lc×12000

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 透射显微镜观察结果

实验各组用药后 3 天均可见视网膜超微结构的改变。以 B、D 组改变明显,视网膜层次结构稍紊乱,核周间隙增宽,内质网扩张(图 3),高倍镜下见线粒体肿胀、空泡样变性,部分线粒体嵴消失,膜盘结构肿胀、扭曲变形(图 4);C 组可见内质网的扩张(图 5),用药后 2 周 D 组仍可见视网膜组织层次结构紊乱,部分线粒体肿胀,线粒体嵴消失(图 6);B 组视网膜组织有所恢复,A、C 组视网膜层次结构清晰,线粒体无肿胀,膜盘排列整齐(图 7);用药后 1 月时 A、B、C 组视网膜组织结构层次分明,排列整齐,D 组视网膜膜盘扭曲变形,甚至出现断裂(图 8)。

3 讨 论

TA 是一种非水溶性的人工合成的长效糖皮质激素,具有很强的抗炎及抗过敏作用,可减轻渗出、水肿以及毛细血管扩张等非特异性炎性反应。目前在眼科领域广泛应用于治疗视网膜黄斑水肿等疾病。

国产曲安奈德注射液(昆明积大制药有限公司)为微细颗粒的混悬液,静置后微粒下沉,振摇后为乳白色混悬液,其中还含有等渗的氯化钠、0.99% 苯甲醇、0.75% 羧甲基纤维素钠、0.04% 聚山梨醇酯以及少量用于调整 pH 的氢氧化钠或盐酸。TA 可以用于治疗各种过敏性疾病、皮肤结缔组织疾病及骨关节软组织疾病。玻璃体腔内注射 TA 治疗黄斑水肿始于 2001 年,最初用于治疗葡萄膜炎所致的黄斑水肿[8],此后越来越多用于治疗各种难治性黄斑水肿。随着玻璃体腔内注射 TA 的广泛应用,其对视网膜是否存在毒性作用越来越引起人们的关注。现有的研究表明糖皮质激素本身不会对视网膜造成毒性作用[9,10],Hida 等[9]发现糖皮质激素所含的赋形剂会导致视网膜毒性反应,且可能与剂量有关。为了避免赋形剂可能的毒性作用,部分医生在玻璃体腔内注射 TA 前,将装有曲安奈德的注射器静置后移去其上清液以去除赋形剂,但是这种方法会使曲安奈德的含量发生改变,无法精确计算注入玻璃体腔内的曲安奈德剂量。目前国产 TA 玻璃体腔内注射的使用大多数仍采用其原制剂,因此研究 TA 的原制剂对视网膜结构的影响可以为其临床应用提供一定的依据。

TA 玻璃体腔内注射的临床应用国内外纳入文献报道的共有 5 种注射剂量,0.1ml(2mg)、0.1ml(4mg)、0.2ml(8mg)、0.2ml(20~25mg),其中 66.09% 的文献报道使用 4mg(0.1ml)的剂量[11]。本实验研究了临床常用剂量 4mg(0.1ml)国产 TA 玻璃体腔注射对视网膜组织结构的影响。我们观察了不同药物作用下 FERG b 波振幅的改变,结果显示不含赋形剂组或者 TA 混悬液组只在短时间内引起 b 波振幅的降低,到一个月时恢复正常,这可能是由于视网膜组织自身反应或者 TA 引起的屈光介质的混浊有关,随着时间的推移 b 波振幅随之升高。而赋形剂组在用药后 3 个时间点 b 波振幅都有降低,这提示赋形剂可以导致视细胞功能的损伤,并且这一损伤可能是持续性的。光学显微镜下观察,实验各组视网膜组织在注药后 3 天有轻度的改变,但不含赋形剂组或者曲安奈德混悬液组随着时间的延长,其改变逐渐恢复正常。赋形剂组到一月时仍有内核层细胞数量的减少。电子显微镜下观察发现实验各组视网膜在用药后 3 天有轻度组织结构的破坏,但不含赋形剂组或者曲安奈德混悬液组的这种破坏是暂时性的,随着时间的延长逐渐消失,到用药后 1 月视网膜组织恢复正常,而赋形剂对视网膜结构的影响持续到 1 个月。我们推测 TA 混悬液玻璃体腔注射在早期会对视网膜组织产生一定影响,可能是视网膜对异物的一种暂时性的反应以及赋形剂的毒性作用,但是随着时间的延长,这种影响便会消失,这与 Dustin 等[12]的研究基本一致。由于赋形剂的存在对视网膜的影响,我们建议 TA 成品在临床应用中去除其赋形剂,以减少其对视网膜的损伤。本实验结果为 TA 的临床应用提供了一定的依据,但其临床应用的毒性反应还需大样本、长期的随访观察。

参 考 文 献

[1] 耿 爽,叶俊杰. 曲安奈德在眼科的应用[J]. 国外医学眼科学分册,2005;29(3):190-195.

[2] KivilCim M,Peyman GA,El-Dessouky ES,et al. Retinal toxicity of triamcinolone acetonide in silicone-filled eyes [J]. Ophthalmic Surg Lasers,2000;31(6):474-478.

[3] Moshfeghi DM,Kaiser PK,Scott IU,et al. Acute endophthalmitis following intravitreal triamcinolone acetonide injection[J]. Am J Ophthalmol,2004;136(2):791-796.

[4] Moshfeghi AA,Scott IU,Flynn HW,et al. Pseudohypopyon after

(下转第 1313 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

与生理盐水组比较，$^{*}P<0.05$ ，$^{**}P<0.01$。野马追大、中、小剂量组小鼠气管中的左氧氟沙星浓度分别约为空白组小鼠的 4.58、3.18、1.86 倍。野马追大、中、小剂量组之间也有显著性差异。

3 讨 论

近年来，随着野马追产品在临床的广泛使用，人们对其各方面展开了全面和深入的研究，但较多的是在药效学方面。有文献研究了野马追镇咳、祛痰、平喘、抗炎、抗菌的作用[4]；研究了其一般药理学作用[5]；有文献指出野马追对豚鼠离体平滑肌有松弛作用[6]。但在野马追和其它药物的相互作用方面研究较少，本实验探讨野马追对临床常用抗生素左氧氟沙星代谢的作用，主要研究了野马追对左氧氟沙星在小鼠气管分布的影响。左氧氟沙星是氧氟沙星的左旋体，具有广谱抗菌活性，对革兰氏阳性和阴性菌及其它微生物都有作用，能同时抑制细菌的 DNA 解螺旋酶和拓扑异构酶而抑制细菌繁殖[2]，在呼吸系统疾病中有广泛的用途。根据实验结果，野马追能显著提高小鼠气管冲洗液中左氧氟沙星的浓度，且有量效关系；其作用明显强于氯化铵。据相关文献[4]，两者在促进小鼠气管酚红分泌的实验中，氯化铵的效果要强于野马追，故可能两者促进左氧氟沙星在小鼠气管中的分布和促进酚红分泌的机制是不同的。原因可能是因为氯化铵促进酚红在小鼠气管的分泌是通过增强腺体的分泌，酚红在体内主要与白蛋白结合，通过此种方式分泌到气管中；而左氧氟沙星是小分子物质，且蛋白结合率低，透过生物膜的方式主要是自由扩散，在气管粘膜的分布主要依赖局部血流。野马追可能通过扩张气管局部血管，促进左氧氟沙星向气管粘膜顺浓度梯度扩散. 野马追促进左氧氟沙星在小鼠气管中分布的机制研究还有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 江苏新医学院.《中药学大辞典》(下册)[M]. 上海：上海科学技术出版社，1999.2130(4365).

[2] Katherine F, Croom, Caren L. Goa. Levofloxacin-A review of Its Use in the Treatment of Bacterier Infections in the United States[J]. Drugs, 2003;63(24):2769-2862.

[3] 张先洲，陈晓莉，韩世平.RP-HPLC 法测定加替沙星浓度[J]. 中国药师，2002;7(9):715-716.

[4] 周远大，吴 妍，朱深银.野马追抗菌、止咳、平喘作用[J]. 中国药房，2001;12(12):716-718.

[5] 周远大，陈 康，何海霞.野马追一般药理作用实验研究[J]. 中国药房，2005;16(2):94-96.

[6] 唐春萍，江 涛，陈志燕.野马追对豚鼠离体气管平滑肌收缩功能的影响[J]. 中药药理与临床，2002;18(6):30-32.

(上接第 1255 页)

intravitreal triamcinolone acetonide iniection for cystoid macular edema[J]. Am J Ophthalmol, 2004;138(3):489-492.

[5] Raja N, Jeanie KM, Cristina K, et al. Toxicity of Triamcinolon Acetonide on Retinal Neurosensory and Pigment Epithelial Cells[J]. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2006;47(2):722-728.

[6] Ozkiris A, Erkilic K. Complication of intravitreal injection of triamcinolone acetonide[J]. Can J Ophthalmol, 2005;40(1):63-68.

[7] Hernaez-ortega MC, Soto-Pedre E. A sample and rapid method for purification of triamcinolone acetonide suspension for intravitreal iniection. Ophthalmic Surg Lasers Imaging;2004;35(4):350-351.

[8] Antcliff RJ, Splalton DJ, Stanford MR, et al. Intravitreal triamcinolone for uveitic cystoid macular edema:an optical coherence tomography study[J]. Ophthalmology, 2001;108(4):765-772.

[9] Hida T, Chandler D, Arena JE, et al.Experimental and clinicalobservations of the intraocular toxicity of commercial corticosteroid preparations[J]. Am J Ophthalmol, 1986;101(2):190-195.

[10] Gillies M, Simpson JM, Billson FA, et al. Safety of an intravitreal injection of triamcinolone .results from a randomized clinical trial[J]. Arch Ophthalmol, 2004;22(3):336-340.

[11] 赵明威，胡庆军，黎晓新.玻璃体内注射曲安奈德治疗黄斑水肿临床研究的现状分析[J]. 中华眼底病杂志，2005;21(4):220-223.

[12] Dustin D, Bo Lei, Keqing Zhang et al. Electroretinographic Effects of an Intravitreal Injection of Triamcinolone in Rabbit Retina [J]. Arch Ophthalmol, 2005;123(11):1563-1569.