

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.23.002

文章编号: 1005-8982(2017)23-0007-06

## 奈帕芬胺对角膜组织中前列腺素 E2 的作用研究\*

刘岩<sup>1</sup>, 张潇<sup>2</sup>, 苏杰<sup>1</sup>

(1. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学, 河北 唐山 063210)

**摘要:目的** 通过复制兔眼前节缺血(ASI)模型,检测模型角膜中前列腺素 E2(PGE2)的表达,探讨奈帕芬胺在角膜组织中对 PGE2 的抑制作用。**方法** 将 54 只已排除眼疾的健康雄性纯种大耳白兔随机分成对照组(18 只兔,36 只眼)和手术组(36 只兔,72 只眼)。手术组 36 只兔的左眼(36 只眼)为缺血组,右眼(36 只眼)为治疗组。不同时间在裂隙灯显微镜下观察各组角膜的变化,然后取角膜做病理学检查和免疫组织化学检查,观察各时间 PGE2 在角膜中的表达。**结果** 缺血组各时间点 PGE2 表达增高( $P < 0.05$ ),治疗组 PGE2 表达较缺血组下降( $P < 0.05$ )。**结论** 在 ASI 的发病过程中,PGE2 发挥重要作用,奈帕芬胺在角膜组织中可有效抑制 PGE2。

**关键词:** 奈帕芬胺;前列腺素 E2;角膜;眼前节缺血

**中图分类号:** R772.2

**文献标识码:** A

## Effect of Nepafenac on prostaglandin E2 in corneal tissue\*

Yan Liu<sup>1</sup>, Xiao Zhang<sup>2</sup>, Jie Su<sup>1</sup>

(1. The Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

**Abstract: Objective** To set up a rabbit model of anterior segment ischemia (ASI) with the method of multi-rectus tenotomy, and to investigate the expression of PGE2 in cornea of the model and the effect of Nepafenac on corneal PGE2. **Methods** Fifty-four purebred health male Japanese White Rabbits without eye diseases were randomly divided into two groups. There were 18 rabbits (36 eyes) in the control group and 36 rabbits (72 eyes) in the operation group which were further randomly divided into ischemic group (36 left eyes of the 36 rabbits) and treatment group (36 right eyes of the 36 rabbits). The changes of cornea were observed under slit-lamp in different periods in each group. Then the cornea tissue was taken for pathological and immunohistochemical examinations, the expression of PGE2 in cornea tissue was observed at different time. **Results** At each time point, the expression of PGE2 in the ischemic group increased ( $P < 0.05$ ), the expression of PGE2 in the treatment group reduced compared to the ischemia group with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** PGE2 may play an important role during the onset of ASI. Nepafenac can effectively restrain PGE2 in the corneal tissue.

**Keywords:** Nepafenac; prostaglandin E2; cornea; anterior segment ischemia

眼前节缺血(anterior segment ischemia, ASI)是斜视矫正术和视网膜脱离术后的严重并发症<sup>[1]</sup>。前列腺素 E2(prostaglandins E2, PGE2)可引起眼损伤(包括手术后的血管扩张、血管的通透性增加、血-房水屏障瓦解及白细胞趋化等),还能导致炎症、疼痛,增

加眼内压及晶状体性黄斑囊样水肿的发生概率等<sup>[2]</sup>。

奈帕芬胺具有渗透力强、靶向作用强、毒副作用小等优点<sup>[3]</sup>,近年来为国际眼科界的研究热点。本实验检测兔眼前节缺血模型角膜中 PGE2 的表达,探讨奈帕芬胺对其的抑制作用。

收稿日期:2016-12-01

\* 基金项目:河北省卫计委课题(No:20170198);河北省唐山市科技局课题(No:13130292z);华北理工大学教改课题(No:z1516-07)

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

排除眼疾的健康雄性纯种大耳白兔 54 只(华北理工大学动物中心),体重( $2.0 \pm 0.2$ )kg。饲养于华北理工大学动物中心动物房内,温度 20 ~ 25℃,饲料购自华北理工大学动物中心,喂食 4 次/d,生长环境相同。

### 1.2 方法

实验动物随机分成对照组(18 只兔,36 只眼)和手术组(36 只兔)。手术组再分为缺血组 36 只眼(左眼)和治疗组 36 只眼(右眼)。对照组 36 只眼行球结膜 360° 剪开,未伤及肌肉和血管;手术组 72 只眼截断 4 条直肌,烧灼闭塞涡静脉后,将离断的直肌后徙约 5 mm,并固定缝合在浅层巩膜上<sup>[3-4]</sup>,缺血组(左眼)结膜囊内点滴平衡盐溶液 1 滴/次,4 次/d;治疗组(右眼)结膜囊内点滴 0.1% 奈帕芬胺混悬液 1 滴/次,4 次/d。手术后 3 h、6 h、24 h、第 3 天、第 7 天及第 14 天摘取眼球,大量生理盐水冲洗后固定;12 h 后取角膜再固定 24 h,做石蜡切片,行苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,免疫组织化学法检测 PGE2 的表达。

### 1.3 免疫组织化学法

将包埋好的标本做成与角膜虹膜睫状体矢状轴平行的切片,厚约 2.5  $\mu$ m,放置于预先用 APES 处理的载玻片上,60℃ 温箱烤片过夜,二甲苯脱蜡,梯度酒精复水。新鲜配制 3% 双氧水 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温 10 min,以灭活内源性酶,蒸馏水洗 2 min/次,共 3 次。将切片置于 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中,微波炉 120 W 加温 12 min 至温度 >95℃,放置 10 min 后,240 W 加温 4 min,自然冷却,冷却后 PBS(pH 7.2)洗涤 1、2 次。滴加正常山羊血清,室温 10 min,甩去多余液体,不洗。滴加抗 PGE2 抗体,37℃ 标记 2 h, PBS(pH 7.2)洗 2 min/次,共 3 次。滴加生物素化山羊抗鼠 IgG,37℃ 孵育,20 min, PBS(pH 7.2)洗 2 min/次,共 3 次。滴加试剂辣根酶标记链卵白素工作液,37℃ 孵育,20 min, PBS(pH 7.2)洗 5 min/次,共 4 次。DAB 显色,显微镜下控制至显色满意后自来水终止显色反应,并充分水洗。苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,显微镜下观察。

### 1.4 术后观察及结果判定

1.4.1 术后角膜观察 用裂隙灯显微镜观察术后角膜改变,记录每日观察结果,并按角膜病变程度进行

评分,计分标准<sup>[4]</sup>:①角膜透明度:角膜清亮计 0 分;角膜轻度浑浊计 1 分;角膜浑浊加重,前房仍清晰可见计 2 分;角膜浑浊继续加重,前房仅模糊可见计 3 分;角膜全水肿浑浊,前房看不到计 4 分;②角膜水肿程度:角膜无水肿计 0 分;角膜轻度基质增厚计 1 分;角膜出现弥漫性基质水肿计 2 分;角膜出现弥漫性基质水肿并出现上皮 Microcytic 水肿计 3 分;角膜出现大疱性角膜病变计 4 分;③角膜新生血管:无角膜新生血管计 0 分;角膜周边可见新生血管计 1 分;角膜新生血管未达瞳孔区计 2 分;新生血管达瞳孔区未完全覆盖角膜计 3 分;全角膜均可见新生血管计 4 分。总分 = 角膜透明度评分 + 角膜水肿程度评分 + 角膜新生血管评分。

1.4.2 定量分析免疫组织化学法结果 PGE2 免疫组织化学法的阳性表达为细胞浆呈现黄色或棕黄色染色。显微镜下弱阳性表现为黄色或微弱的棕黄色,阳性表现为棕黄色,强阳性表现为棕褐色。本研究应用半定量的积分法,在双盲情况下每张切片随机取 2 个 400 倍视野,依据染色强度评分:阴性计 0 分,弱阳性计 1 分,阳性计 2 分,强阳性计 3 分。阳性细胞比例则用 1 个视野内的阳性染色细胞数占细胞总数的百分比来表示:1% ~ 10% 计 1 分,11% ~ 50% 计 2 分,51% ~ 80% 计 3 分,<80% 计 4 分。免疫组织化学法评分 = 染色强度  $\times$  阳性细胞比例。

### 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 术后角膜改变

裂隙灯显微镜下观察,对照组角膜未见明显改变。缺血组术后 3 h 角膜未见水肿;术后 6 h 开始出现轻度水肿浑浊但前房清晰可见;术后 24 h 水肿程度加重,基质层轻度增厚,前房仍可见;术后第 3 天水肿程度明显加重,出现弥漫性的基质水肿,前房开始模糊但仍可见(见图 1);术后第 7 天水肿严重,表现为角膜全部呈现白色浑浊,前房已观察不到, Microcytic 水肿大量出现,甚至出现疱性角膜变性 5 例,新生血管 3 例(见图 2)。术后第 14 天与第 7 天比较,水肿减轻,在裂隙灯下可观察到前房,2 例水肿完全消退,其余仍残余基质水肿,角膜大疱消失,6 例可观察到角膜缘出现新生血管。

与缺血组比较,治疗组在 3、6 和 24 h 区别不明显,术后第 3 天表现为角膜轻度浑浊,前房清晰可见;术后第 7 天角膜浑浊但前房模糊可见,未观察到角膜大疱,可观察到角膜缘的新生血管 2 例;术后第 14 天角膜恢复透明,前房均清晰可见。1 例角膜缘可见新生血管。

### 2.2 缺血组与治疗组角膜病变评分比较

缺血组与治疗组术后 3 h、6 h、24 h、3 d、7 d 和 14 d 的角膜评分比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间的角膜病变评分有差异( $F=18.557, P=0.007$ );②缺血组与治疗组的角膜病变评分有差异( $F=34.362, P=0.001$ ),治疗组比缺血组角膜评分

低,相对角膜病变较轻;③缺血组与治疗组的角膜病变评分变化趋势有差异( $F=14.372, P=0.000$ )。见表 1 和图 3。

### 2.3 病理结果

**2.3.1 HE 染色** 对照组角膜上皮细胞呈立方形,排列整齐,基质层纤维排列整齐(见图 4)。缺血组术后 3 h 角膜无明显变化;术后 6 h 角膜上皮细胞仍排列整齐,未见水肿,但基质层排列轻度疏松;术后 24 h 角膜上皮细胞排列出现紊乱,角膜缘基质排列更加疏松;术后第 3 天出现角膜上皮细胞肿胀,基质内有炎症细胞浸润;术后第 7 天角膜内皮细胞肿胀更加严重,部分脱落,基质层炎症细胞增多,以淋巴细胞为

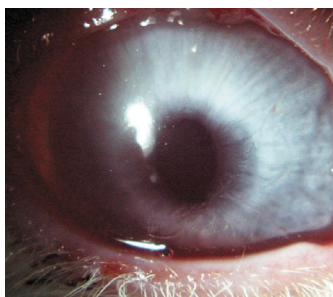


图 1 缺血组第 3 天

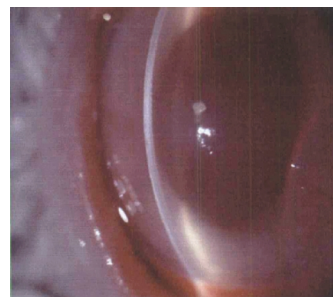


图 2 缺血组第 7 天

表 1 两组角膜病变评分比较 (n=36,分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 3 h         | 6 h         | 24 h        | 3 d         | 7 d         | 14 d        |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 缺血组 | 0.33 ± 0.52 | 1.72 ± 0.52 | 2.67 ± 0.51 | 4.60 ± 0.55 | 8.40 ± 0.82 | 3.67 ± 1.04 |
| 治疗组 | 0.20 ± 0.45 | 1.05 ± 0.45 | 1.73 ± 0.55 | 2.54 ± 0.84 | 6.60 ± 0.89 | 1.40 ± 0.87 |

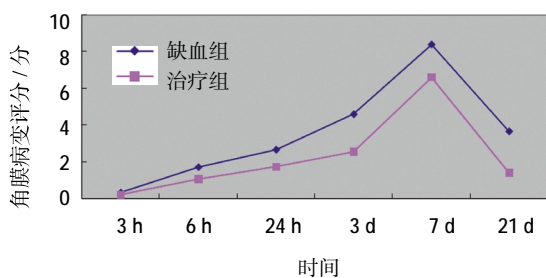


图 3 两组角膜病变评分变化

主,可见红细胞游出,3 例角膜缘出现细小的新生血管(见图 5);术后第 14 天角膜缘浅层角膜存在大量的炎症细胞,仍以淋巴细胞为主,可见红细胞,6 例角膜缘出现细小的新生血管。

**2.3.2 病理改变** 与缺血组比较,治疗组各时间角膜的病理改变明显减轻。治疗组术后 3、6 和 24 h 角膜基本正常。术后第 3 天角膜上皮开始水肿,但细胞排列较规整。术后第 7 天角膜上皮细胞轻度水肿,可见少量炎症细胞渗出,以淋巴细胞为主。1 例角膜缘出

现细小的新生血管(见图 6)。术后第 14 天角膜基本恢复正常,1 例角膜缘出现细小的新生血管。

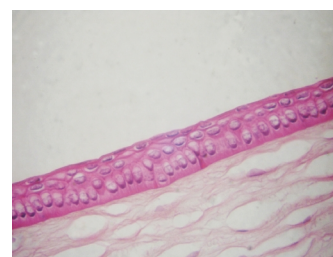


图 4 对照组角膜 (HE × 400)

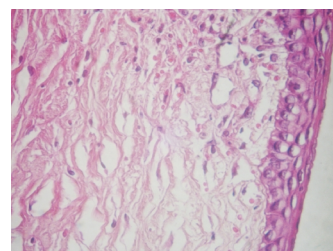


图 5 缺血组第 7 天角膜 (HE × 400)

### 2.4 PGE2 的免疫组织化学法结果

对照组仅角膜基质细胞可见 PGE2 弱阳性表达(见图 7)。

缺血组术后 3 h,在角膜基质可见 PGE2 弱阳性表达,角膜上皮细胞层基底细胞处可见 PGE2 弱阳性表达;6 和 24 h 角膜基质 PGE2 表达增强,角膜上皮细胞层基底细胞处可见 PGE2 弱阳性表达,同时表层细胞出现弱阳性表达;第 3 天开始细胞 PGE2 表达升高;第 7 天上皮细胞、基质细胞中 PGE2 变现为强阳性表达,阳性细胞数增多,呈棕褐色强着色,阳性血管数增加(见图 8);第 14 天 PGE2 的染色强度下降。

治疗组在 4 条直肌离断后,给予奈帕芬胺进行干预,角膜 PGE2 表达强度变化趋势与对照组相似,但治疗组角膜 PGE2 表达明显减弱(见图 9)。

### 2.5 3 组角膜的 PGE2 免疫组织化学法评分比较

缺血组、治疗组与对照组术后 3 h、6 h、24 h、3 d、7 d 和 14 d 的 PGE2 免疫组织化学法评分比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间的

PGE2 免疫组织化学法评分有差异( $F=12.970, P=0.002$ );②缺血组、治疗组与对照组的 PGE2 免疫组织化学法评分有差异( $F=17.572, P=0.000$ ),缺血组、治疗组 PGE2 免疫组织化学法评分较对照组高,治疗组 PGE2 免疫组织化学法评分较缺血组低;③缺血组、治疗组与对照组的角膜 PGE2 免疫组织化学法评分变化趋势有差异( $F=10.190, P=0.000$ )。见表 2 和图 10。



图 8 缺血组第 7 天角膜 PGE2 的表达 (HE × 400)



图 9 治疗组第 7 天角膜 PGE2 的表达 (HE × 400)

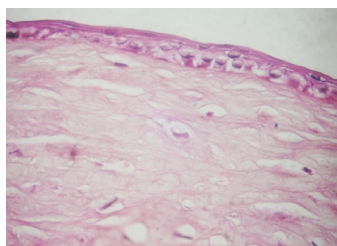


图 6 治疗组第 7 天角膜 (HE × 400)



图 7 对照组角膜 PGE2 的表达 (HE × 400)

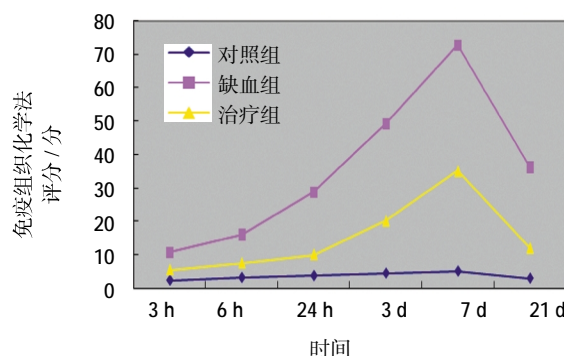


图 10 3 组角膜 PGE2 免疫组织化学法评分变化

表 2 3 组角膜 PGE2 免疫组织化学法评分比较 (n=36,分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 3 h          | 6 h          | 24 h         | 3 d          | 7 d          | 14 d         |
|-----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 对照组 | 2.47 ± 0.52  | 3.28 ± 0.69  | 3.85 ± 0.56  | 4.59 ± 0.83  | 5.21 ± 0.74  | 3.07 ± 0.87  |
| 缺血组 | 10.96 ± 0.58 | 16.23 ± 0.89 | 28.96 ± 1.07 | 49.27 ± 1.52 | 72.79 ± 1.84 | 36.39 ± 1.55 |
| 治疗组 | 5.52 ± 0.95  | 7.62 ± 0.73  | 10.20 ± 0.78 | 20.27 ± 0.69 | 35.23 ± 1.27 | 12.09 ± 0.67 |

## 3 讨论

眼前节缺血综合征是潜在的致盲因素之一,可以表现为全身性疾病中眼部的损害,也可以表现为

某些眼部疾病的直接反应。当其表现为眼部手术并发症时,则更具有临床意义<sup>[9]</sup>。本综合征临床表现为从角膜到眼内各结构的损害,这是眼部各个结构出

现非特异性组织水肿,继而出现渗出甚至出血等改变的结果。

目前,国内外对于眼前节缺血的发生机制,仍未明确,大部分人推测该病发生、发展的过程为低灌注压引起组织缺氧,继而导致细胞坏死,再引发眼内的炎症反应。本实验在裂隙灯显微镜下观察角膜,对照组除结膜充血、水肿外,未发现角膜水肿浑浊;而缺血组和治疗组发生明显角膜水肿且角膜病变评分高于对照组。推测眼前节缺血后出现以上病理变化的原因是眼的血-房水屏障被破坏。该屏障为上皮型屏障,主要位于眼内睫状体的上皮细胞。一旦该屏障被破坏,即引起毛细血管内皮细胞间的连接被打开,内皮细胞间缝隙加大,从而导致血管腔内的大分子渗漏出来,使房水的成分受到明显影响,继而导致角膜出现水肿等病变。

在对角膜 PGE2 表达强度进行组间同一时间及组内不同时间分析时发现,缺血组和治疗组表现为各相邻时间有差异,PGE2 的表达从术后 3 h 即开始升高,到术后第 7 天达峰值,术后第 14 天又较前下降。由此推测由于眼前节组织血液供应障碍,组织内低灌注引起缺血缺氧,PGE2 表达上调,导致眼内炎症。据此提示 PGE2 在眼前节缺血的发病中发挥作用,寻找能有效抑制 PGE2 的药物可能成为治疗眼前节缺血的方法之一。

奈帕芬胺是眼科新研发的非甾体类解热镇痛抗炎药。奈帕芬胺不仅渗透力、靶向作用较传统非甾体类解热镇痛抗炎药强,而且毒副作用较其明显减小<sup>[6]</sup>,近年来已经成为国际眼科用药的研究热点,主要用于白内障术后疼痛和炎症的治疗。奈帕芬胺极性较小,离子影响相关的角膜上皮吸收减少<sup>[9]</sup>,增加期对特定组织的渗透性<sup>[10-12]</sup>。实验表明,期能够比溴芬酸和酮咯酸更迅速地渗透过兔离体角膜组织<sup>[10,12]</sup>,并分散到房水、虹膜、睫状体、视网膜及脉络膜中<sup>[1]</sup>。而奈帕芬胺在角膜内的生物转化是可以忽略不计的<sup>[12]</sup>,这使其在角膜的毒性最小。奈帕芬胺是仅有的能生物转化为氨芬酸<sup>[9]</sup>的物质。氨芬酸是一种芳基乙酸衍生物,通过抑制前列腺素 H 合成酶(环氧化酶-2),阻断前列腺素的合成,来发挥抗炎止痛的作用。体外对奈帕芬胺、氨芬酸、吡咯酸及溴芬酸的药效学研究显示,氨芬酸对环氧化酶-2 的抑制活性最强<sup>[7]</sup>。而奈帕芬胺可通过抑制环氧化酶-2,抑制血管内皮生长因子,从而抑制新生血管生成<sup>[13]</sup>。应用于糖尿病视网膜病变的奈帕芬胺滴眼液正在爱尔康公司进行 III

期临床试验<sup>[14]</sup>。目前其在眼前节缺血治疗方面尚无报道。本实验在兔眼球结膜囊内点滴 0.1% 奈帕芬胺混悬液进行治疗。在观察结果时发现,当对照组、缺血组及治疗组在各时间进行比较时,缺血组、治疗组的角膜病变评分和角膜 PGE2 免疫组织化学法评分高于对照组,而治疗组角膜病变评分和 PGE2 免疫组织化学法评分低于缺血组。结果证实,在眼前节缺血的发病过程中,通过结膜囊内点滴奈帕芬胺即可明显抑制角膜组织中 PGE2 的含量,改善角膜水肿症状,抑制角膜新生血管。说明奈帕芬胺可有效穿透角膜,抑制 PGE2 的作用,及时控制炎症反应,抑制角膜新生血管,取得满意的效果。

有研究表明,局部应用奈帕芬胺 15 min 即可起效,且作用持续 $\geq 8$  h<sup>[7]</sup>。本实验结果证实,治疗组术后 3 h 奈帕芬胺即开始显效,3 d 作用显著,7 d 效果达高峰,14 d 治疗仍有效。奈帕芬胺抑制 PGE2 的作用机制为其可以在眼内水解酶的作用下转换成更具有活性的氨芬酸<sup>[9]</sup>。氨芬酸是一种芳基乙酸衍生物,通过抑制前列腺素 H 合成酶来阻断前列腺素的合成,以发挥抗炎止痛的作用。

总之,结膜囊内点滴奈帕芬胺治疗对保护眼前节缺血时角膜组织的形态和功能起到重要的作用。

#### 参 考 文 献:

- [1] TANAKA T, MATSUO T, OHTSUKI H. Aqueous vascular endothelial growth factor increases in anterior segment ischemia in rabbits[J]. *Jpn J Ophthalmol*, 1998, 42(2): 85-89.
- [2] MUTOH M, WATANABE K, KITAMURA T, et al. Involvement of Prostaglandin E Receptor subtype EP (4) in colon carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 28-32.
- [3] LANE S S. Nepafenac: a unique nonsteroidal prodrug[J]. *Int Ophthalmol Clin*, 2006, 46: 13-20.
- [4] HOLLAND E J. Clinical and immunohistological studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model[J]. *Cornea*, 1991, 10: 374.
- [5] 张晓, 庞毅. 斜视矫正手术的常见并发症及其处理[J]. *山东医药*, 1999, 39(13): 40.
- [6] HARGRAVE S L, JUNG J C, FINI E, et al. Possible role of the vitamin E solubilizer in topical diclofenac on matrix metalloproteinase expression in corneal melting[J]. *Ophthalmology*, 2002, 109: 343-350.
- [7] STEWART W C, STEWART R, MAXWELL W A, et al. Preoperative and postoperative clinical evaluation of nepafenac 0.1% ophthalmic suspension for postcataract inflammation[J]. *American Society of Cataract and Refractive Surgery*, 2005, 18(4): 309-311.
- [8] GAYNES B I, ONYEKWULUJE A. Topical ophthalmic NSAIDs:

- a discussion with focus on nepafenac ophthalmic suspension [J]. *Clinical Ophthalmology*, 2008, 2(2): 355-368.
- [9] LINDSTROM R, KIM T. Ocular permeation and inhibition of retinal inflammation: an examination of data and expert opinion on the clinical utility of nepafenac [J]. *Curr Med Res Opin*, 2006, 22: 397-404.
- [10] KE T L, GRAFF G, SPELLMAN J M, et al. Nepafenac, a unique nonsteroidal prodrug with potential utility in the treatment of trauma-induced ocular inflammation: II. In vitro bioactivation and permeation of external ocular barriers [J]. *Inflammation*, 2000, 24: 371-384.
- [11] LINDSTROM R, KIM T. Ocular permeation and inhibition of retinal inflammation: an examination of data and expert opinion on the clinical utility of nepafenac [J]. *Curr Med Res Opin*, 2006, 22: 397-404.
- [12] WALTERS T, RAIZMAN M, ERNEST P, et al. In vivo pharmacokinetics and in vitro pharmacodynamics of nepafenac, amfenac, ketorolac and bromfenac [J]. *Cataract Refract Surg*, 2007, 33: 1539-1545.
- [13] 时毅, 崔红平. 角膜新生血管临床治疗的研究进展 [J]. *眼科新进展*, 2016, 36(11): 1097-1100.
- [14] 杜海洲. 国际抗糖尿病药物研发新进展 [J]. *药学进展*, 2014, 38(3): 185-195.

(童颖丹 编辑)