

吡非尼酮抗纤维化作用在眼科的应用

杨 晓,袁援生,钟 华

基金项目:眼科学国家重点实验室开放课题;云南省应用基础研究项目联合专项(No. 2010CD162)

作者单位:(650032)中国云南省昆明市,昆明医科大学第一附属医院

作者简介:杨晓,在读硕士研究生,研究方向:青光眼、白内障、眼底病。

通讯作者:钟华,男,毕业于中山大学中山眼科中心,博士,副教授,硕士研究生导师,云南省卫生厅眼科学学科带头人,美国《Ophthalmology》、《IOVS》、《Plos ONE》杂志特约审稿人,研究方向:青光眼、白内障、眼底病. zhoculist@163.com

收稿日期:2013-04-24 修回日期:2013-07-16

Application of Pirfenidone anti - fibrosis in ophthalmology

Xiao Yang, Yuan-Sheng Yuan, Hua Zhong

Foundation items: State Key Laboratory of Ophthalmology Topics; Joint Special of Applied Basic Research Projects of Yunnan Province, China (No. 2010CD162)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Yunnan Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Hua Zhong. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Yunnan Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China. zhoculist@163.com

Received:2013-04-24 Accepted:2013-07-16

Abstract

• Pirfenidone is a novel antifibrotic agent that has shown potential in numbers of models and clinical trials. Pirfenidone could inhibit cells proliferation through down-regulating a series of cytokines. Pirfenidone's antifibrotic effect and its safety have been established in organs such as liver, kidney and lung. Current application especially the department of ophthalmology and future researches on Pirfenidone were summarized in this literature.

• **KEYWORDS:** Pirfenidone; antifibrotic; proliferation

Citation: Yang X, Yuan YS, Zhong H. Application of Pirfenidone anti-fibrosis in ophthalmology. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(8):1569-1571

摘要

吡非尼酮是一种新型抗纤维化药物,近年来通过大量临床试验,证明吡非尼酮主要通过下调一系列细胞因子的表达抑制细胞增殖,在肝、肺、肾等全身各组织器官和组织中发挥抗纤维化作用,具有安全、有效及毒副作用小等特点,在临床试验中被用于各种纤维化疾病的治疗。纤维化在青光眼或白内障术后、各种增生性玻璃体视网膜病变中起着重要作用,因此研究者将吡非尼酮试用于眼科增生性病变的研究,本文就吡非尼酮的特点及其在全身和眼科的抗纤维化研究做一综述。

关键词:吡非尼酮;抗纤维化;增殖

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.08.15

引用:杨晓,袁援生,钟华. 吡非尼酮抗纤维化作用在眼科的应用. 国际眼科杂志 2013;13(8):1569-1571

0 引言

眼科常见的各种增生性病变中,尽管发病机制、治疗方式和预后各不相同,但其共同之处是许多细胞和细胞因子的激活和刺激导致细胞的迁移和增殖,对临床的治疗和预后造成了极大的困难。吡非尼酮作为新型、广谱抗炎抗纤维化药物,动物实验研究发现它具有广泛的抗纤维化效应,在临床试验中也被用于全身多种组织纤维化疾病的治疗,具有安全、有效、毒副作用小的特点,因此有望将其应用于眼科增生性病变的预防和治疗。

1 眼科增生性病变概述

增生性玻璃体视网膜病变、增生性糖尿病视网膜病变、青光眼术后滤过泡瘢痕化、后发性白内障等疾病是眼科常见的增生性病变。尽管它们的发病机制、治疗方式和预后各不相同,但其共同之处是许多细胞和细胞因子一起参与病变的发生和发展,病变区炎性因子的激活和刺激导致细胞的迁移和增殖,给眼科医生的临床工作和手术预后带来了极大的挑战。

青光眼最常用的手术方式为小梁切除术,但目前仍然存在一些问题影响手术的成功率,最常见的是术后滤过区 Tenon's 囊纤维增殖造成滤过道的瘢痕化,阻碍房水经由滤过道的正常循环,无法降低眼压^[1]。研究发现,引起青光眼术后滤过道瘢痕化的原因主要是滤过区 Tenon's 囊成纤维细胞(human tenon capsule fibroblasts, HTFs)发生增殖、收缩和迁移,细胞外基质合成增加所致,此外许多细胞因子参与并诱导成纤维细胞的增殖^[2]。所以术中会使用抗代谢药物如丝裂霉素 C(MMC)、5-氟尿嘧啶(5-FU)等防止滤过道瘢痕化,但这些药物仍然可能引起一系列并发症,如术后滤过泡渗漏、角膜水肿、结膜、巩膜坏死、眼内炎等^[3,4]。因此,MMC 和 5-FU 等药物在防止青光眼术后滤过道瘢痕化的形成仍存在缺陷。

白内障患者通过超声乳化吸除联合人工晶状体植入术获得了较为显著的疗效,多数患者的视力较术前得到不同程度的提高。但是术中保留的部分晶状体前囊膜及完整的后囊膜,使残留的晶状体上皮细胞(human lens epithelial cell, LEC)出现增殖、迁移和分化而产生晶状体前囊膜纤维化,转化为成纤维细胞,导致后发性白内障(posterior capsular opacification, PCO)形成^[5],是白内障术后常见的并发症之一。在此过程中,转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)与碱性成纤维生长因子之间的平衡破坏,前者调控 LEC 的上皮-间叶转分化,使囊膜纤维化;后者调控晶状体结构的再生和细胞增殖。成为白内障术后影响患者视功能的主要原因^[6,7]。通过术前选择不同设计的人工晶状体能够减少 PCO 的发生,通过 Nd:YAG 激光可以治疗 PCO,但仍有可能引起炎症、眼压升高、人工晶状体损伤、黄斑水肿及视网膜脱离等

并发症。仍需寻找更有效的方法和药物预防和治疗 PCO 的发生发展。

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是眼科常见的增殖性病变, 外伤、糖尿病、视网膜脱离及视网膜脱离术后等都可引起增生性病变。其主要病理特征为视网膜色素上皮细胞和神经胶质细胞增殖, 并伴有视网膜下和视网膜前膜纤维细胞膜形成^[8]。视网膜受到损伤后, 视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelial, RPE)、神经胶质细胞、巨噬细胞等在细胞因子的作用下发生迁移, 聚集在玻璃体腔和视网膜下, 在此过程中, 细胞发生显型转变, 形成具有收缩功能的纤维增殖膜, 最终导致视网膜脱离。目前, 手术切除增殖膜可明显提高手术成功率, 但仍然有许多患者的术后视力不理想。尤其是严重的 PVR 无论是手术方式还是术后预后情况都不理想, 常需要多次手术。近年来, 许多学者研究 PVR 的基因治疗^[9,10], 但是由于技术尚不完善, 载体的靶向性和组织特异性差, 转导成功率低以及安全性问题, 还未能完全应用于临床。

由此可见, 眼科疾病术后增殖性病变为眼科医生的临床治疗工作带来了重大挑战, 因此, 许多学者尝试寻找更安全有效的药物能够预防和治疗增殖性病变。

2 吡非尼酮的抗纤维化作用

甲苯吡啶酮 (吡非尼酮, pirfenidone, PFD) 是一种新型广谱的抗炎抗纤维化药物, 目前已进入了 III 期临床试验, 属于一种羟基吡啶, 化学名为 5-甲基-1 苯基-2[1H]-吡啶酮, 分子量为 185.2。它是一种小分子药物, 能抑制胶原合成, 下调多种细胞因子的产生, 以及阻止成纤维细胞增殖。PFD 的抗纤维化作用已在动物体内外实验和临床试验中得到证实, 在动物实验中发现它具有广泛的抗纤维化效应, 在临床试验中它被用于全身多种组织纤维化疾病的治疗。

2.1 吡非尼酮抗纤维化和抗炎的作用机制 PFD 的抗纤维化作用主要由于它对细胞因子的调节, 抑制了成纤维细胞的增殖和胶原基质的合成。TGF- β 是参与多种纤维化过程的中枢因子, 它在各个器官的纤维化疾病中都有不同程度的表达, 可以促进成纤维细胞的增殖和生长, 增加胶原合成, 阻止细胞外基质的降解^[11]。大量的研究发现, PFD 能够减少肺、肾脏等器官的成纤维细胞 TGF- β 的表达^[12]。

PFD 的抗纤维化作用, 首先由于它直接抑制 I 型胶原蛋白的表达。在胶原合成过程中, 精氨酸酶将 L-精氨酸转变为尿素和 L-鸟氨酸, 这是胶原合成的重要步骤之一。PFD 能够通过下调精氨酸酶蛋白表达使其活性降低来发挥抑制胶原合成的作用。另外, PFD 降低了同种异基因移植肺内源性 TGF- β 的水平, 而 TGF- β 在肺组织和成纤维细胞内均可激活精氨酸酶^[13]。PFD 还可以抑制肺成纤维细胞 HSP47 的表达^[14], HSP47 作为一种胶原特异性分子伴侣, 调节原骨胶原的分泌, 还能够使肺成纤维细胞胶原蛋白的合成减少, 参与特发性肺纤维化的病理过程。还有研究表明, PFD 能够减少基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的表达, 调节平滑肌细胞增殖和迁移 (MMP-2, MMP-9, MMP-13)^[11,15], 抑制 NAPDH 相关的脂质过氧化反应。在翻译水平上抑制肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) TNF- α 、INF- γ 、IFN-12、IL-6、IL-12 等促炎症细胞因子的生成, 与 MAPK2 和 JNK 的活化无关; 同时却增加了抗炎细胞因子 IL-10 的生成^[16-18]。

2.2 吡非尼酮在组织器官内的分布 PFD 在全身各器官、脑组织、脂肪组织和淋巴结中都有分布, 其中在肝脏内的沉积量最大, 在肾脏的浓度最高, 可能与肾脏是吡非尼酮

代谢的终末器官有关。另外, PFD 在脑组织、脂肪组织和淋巴结均能够维持较高的浓度^[19]。在眼部组织, PFD 具有较好的眼内穿透性^[20], 在角膜、结膜、巩膜和房水中的消除半衰期分别为 18.3, 34.2, 39.5 和 15.7 min, 峰浓度分别达到 9.64, 9.60, 2.13 和 34.88 mg/g。PFD 在这四种组织的半衰期短、代谢快。在玻璃体腔内药物浓度较低为 0.52 mg/L, 半衰期也相对较长为 70.9 min。同时证实了 PFD 滴眼液对眼内组织没有明显的细胞毒副作用, 虽然扫描电镜观察到 10 g/L PFD 滴眼液可引起角膜内皮水肿, 引起细胞间连接突起减少且不规则, 但是都在可逆性损伤范围内。正因为 PFD 在全身各器官和系统都有分布, 所以为 PFD 能够发挥其多器官的抗纤维化作用奠定了基础。

2.3 吡非尼酮的抗纤维化应用 在抗肺纤维化方面, PFD 能够安全有效的用于治疗进展期慢性肺纤维化患者, 且耐受性好, 毒副作用小^[21], 对特发性肺纤维化也有一定的疗效^[22]。同时, 动物实验证明 PFD 可以通过调节 TGF- β 通路来抑制闭塞性细支气管炎造成的损伤^[23]。在抗肝纤维化方面, PFD 主要是通过下调 TGF- β 1 的 mRNA 和 MMP-2, 从而减少原骨胶原 α 和 TIMP-1 的表达来实现的。PFD 能够抑制 PDGF 诱导的肝脏星状细胞的增殖, 同时能抑制 I 型胶原的聚集和 α 1 原骨胶原的 mRNA 表达。此外, 研究表明在肝脏发生损害后使用吡非尼酮依然有效^[24,25]。在抗肾纤维化方面, PFD 可明显下调肾成纤维细胞的活化和增殖, 改善纤维化的进展, 提高肾功能^[26]。在单侧输尿管阻塞的动物模型中, PFD 可抑制 IV 型和 I 型胶原、MMP-2 的 mRNA 表达, 有助于恢复受损的肾功能, 可用于防治进展性、不可逆性的肾功能衰竭^[27]。

此外, 器官移植患者术后发生器官移植慢性功能障碍的共同终点也是纤维化的发生, PFD 通过抑制 TNF- α , 作为同种异基因器官移植排斥的最主要的验证应答调节因子^[28]。同时也可以作为辅助用药在器官移植的早期阶段使用, 不但可阻断早期的炎症反应, 控制慢性移植物的功能障碍, 还能降低皮质类固醇的用量^[29]。

3 吡非尼酮在眼科疾病中的应用

PFD 在大量的实验和临床试验中已经证实了它在全身多种脏器纤维化疾病中显著的抗纤维化效果和较高的安全性。眼部很多增殖性病变的基础也是纤维化, 那么它是否能在眼部也起到安全有效的抗纤维化效果? Zhang 等^[30]在体外培养的人视网膜色素上皮细胞中先加入 TGF- β (1 ~ 10 ng/mL) 促进纤维蛋白的合成, 随后加入 PFD (300 mL/L) 后观察到其对 RPE 细胞抑制作用, 推测 PFD 可以在 RPE 细胞中抑制 TGF- β 介导的纤维蛋白合成, 但缺乏进一步的体内以及其相关机制的研究。

Lin 等^[31]在体外培养的人 Tenon's 囊成纤维细胞中加入不同浓度的 PFD, 观察药物对细胞增生的作用, 结果发现 PFD 通过下调 TGF- β 1、2、3 的细胞因子通路来抑制人 Tenon's 囊成纤维细胞的增殖, 并且这种抑制作用呈浓度依赖性。Zhong 等^[32]将 PFD 制成滴眼液, 建立家兔青光眼滤过手术模型研究 PFD 对抗青光眼术后滤过道瘢痕化的作用。结果表明 5 g/L PFD 滴眼液与空白组相比, 能够长期且有效的维持滤过泡的形态和存活时间; 与术中使用 MMC 相比, 两组滤过泡存活时间相似。应用组织病理学检查进一步发现 5 g/L PFD 滴眼液实验组能够减少滤过通道炎性细胞浸润和成纤维细胞增殖、分化, 维持滤过通道的开放。可以得出 PFD 与 MMC 的作用相似, 且较 MMC 更加安全无毒。

Yang 等^[33]在体外培养的人晶状体上皮细胞 (HLECs) 先加入 TGF- β 2 刺激细胞增殖, 然后加入不同浓度的 PFD (0.3, 0.5, 1.0 mg/mL) 观察药物对细胞的作用。结果发现

PFD 通过下调 TGF- β /Smad 信号通路诱导的人纤维连接蛋白的表达和诱导成纤维细胞显型改变来抑制 HLECs 细胞的增殖、迁移、分化,此抑制作用呈浓度依赖性。虽然选择特殊类型的人工晶状体或者改良的手术方式能够有效减少 PCO 的发生,但由于手术费用昂贵在发展中国家并不能适用于所有人。此项研究结果为 PCO 的预防和治疗提供了新的临床用药方法,而且费用少,安全性高。

目前 PVR 的治疗主要是手术治疗,并且随着手术设备和器械的不断完善,填充材料的不断改进,使 PVR 的手术方式更加微创精细。但临床工作中我们发现即使再微创的手术操作也不能够完全阻止视网膜脱离的复发,而且反复过度的手术创伤将进一步刺激 PVR 的发生发展。因此寻找一种安全有效的抗增生药物辅助手术治疗极为重要。王晶等^[34]在传代培养的永生化 RPE 细胞中加入不同浓度的 PFD(0.3,0.5mg/mL)观察药物对细胞的作用,结果发现 PFD 能够抑制 TGF- β_1 、TGF- β_2 、Smad2/3、Smad4 蛋白合成表达,通过下调 TGF- β /Smad 信号通路发挥对 RPE 细胞增殖、迁移及分化的抑制,这种抑制作用与其细胞毒性无关。此项研究为 PFD 用于防治 PVR 提供了重要的实验依据和理论基础。

4 吡非尼酮的眼科应用前景

综上所述,PFD 除了能够在全身大部分器官发挥其抗纤维化作用外,最新的研究显示其对眼部许多增殖性病变更有抗增殖作用,但还限于实验性研究,仍需要更进一步的深入研究来证实。由于 PFD 具备应用广泛、全身有用、局部有效、安全无毒的特点,有望开展更多大规模临床随机对照试验,将其进一步用于更多的眼部增殖病变中,丰富常见眼科疾病术后增殖性病变的给药途径和方式,具有极大的应用前景。

参考文献

- 1 Wilgus TA, Ferreira AM, Oberyszyn TM, et al. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2008;88(6):579-590
- 2 Cordeiro MF, Bhattacharya SS, Schultz GS, et al. TGF- β_1 , - β_2 , and - β_3 in vitro: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:756-763
- 3 Chen JL, Hodapp EA, Blieden LS, et al. Effect of cataract surgery and 5-Fluorouracil on trabeculectomy function. *Arch Ophthalmol* 2012;130(10):1353
- 4 Cheng JW, Xi GL, Wei RL, et al. Efficacy and tolerability of nonpenetrating filtering surgery in the treatment of open-angle glaucoma: a meta-analysis. *Ophthalmologica* 2010;224(3):138-146
- 5 Spalton D. Posterior capsule opacification: have we made a difference? *Br J Ophthalmol* 2013;97(1):1-2
- 6 Wormstone IM, Tamiya S, Anderson I, et al. TGF β 2-induced matrix modification and cell transdifferentiation in the human lens capsular bag. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2301-2308
- 7 Dawes LJ, Angell H, Sleeman M, et al. TGF β isoform dependent SMAD2/3 kinetics in human lens epithelial cells: a cellomics analysis. *Exp Eye Res* 2007;84:1009-1012
- 8 Charteris DG, Sethi CS, Lewis GP, et al. Proliferative vitreoretinopathy-developments in adjunctive treatment and retinal pathology. *Eye (Lond)* 2002;16(4):369-374
- 9 Yang P, McKay BS, Allen JB, et al. Effect of mutant IkappaB on cytokine-induced activation of NF-KappaB in cultured human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(3):1339-1347
- 10 Oshima Y, Sakamoto T, Hisatomi T, et al. Gene transfer of soluble TGF-beta type II receptor inhibits experimental proliferative vitreoretinopathy. *Gene Ther* 2002;9(18):1214-1220
- 11 Tian XL, Yao W, Guo ZJ, et al. Low dose pirfenidone suppresses transforming growth factor beta-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and protects rats from lung fibrosis induced by bleomycin. *Chin Med Sci J* 2006;21(3):145-151
- 12 Dosanjh A, Ikonen T, Wan B, et al. Pirfenidone: A novel anti-

fibrotic agent and progressive chronic allograft rejection. *Pulm Pharmacol Ther* 2002;15(5):433-437

13 Liu H, Drew P, Gaugler AC, et al. Pirfenidone inhibits lung allograft fibrosis through L-arginine-arginase pathway. *Am J Transplant* 2005;5(6):1256-1263

14 Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, et al. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts. *Life Sci* 2008;82(3-4):210-217

15 Waller JR, Murphy GJ, Bicknell GR, et al. Pirfenidone inhibits early myointimal proliferation but has no effect on late lesion size in rats. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23(3):234-240

16 Nakazato H, Oku H, Yamane S, et al. A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor-alpha at the translational level. *Eur J Pharmacol* 2002;446(1-3):177-185

17 Grattendick KJ, Nakashima JM, Feng L, et al. Effects of three anti-TNF-alpha drugs: etanercept, infliximab and pirfenidone on release of TNF-alpha in medium and TNF-alpha associated with the cell in vitro. *Int Immunopharmacol* 2008;8(5):679-687

18 Iyer SN, Hyde DM, Giri SN. Anti-inflammatory effect of pirfenidone in the bleomycin-hamster model of lung inflammation. *Inflammation* 2000;24(5):477-491

19 Bruss ML, Stanley SD, Margolin SB, et al. Pharmacokinetics and metabolism of intravenous pirfenidone in sheep. *Biopharm Drug Dispos* 2008;29(2):119-126

20 Sun G, Lin X, Zhong H, et al. Pharmacokinetics of pirfenidone after topical administration in rabbit eye. *Molecular Vision* 2011;17:2191-2196

21 Nagai S, Hamada K, Shigematsu M, et al. Open-label compassionate use one year-treatment with pirfenidone to patients with chronic pulmonary fibrosis. *Intern Med* 2002;41(12):1118-1123

22 Bhatt N, Baran CP, Allen J, et al. Promising pharmacologic innovations in treating pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6(3):284-292

23 Zhou H, Latham CW, Zander DS, et al. Pirfenidone inhibits obliterative airway disease in mouse tracheal allografts. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(10):1577-1585

24 Rockey DC. Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease. *Clin Liver Dis* 2008;12(4):939-962

25 Di A, Bendia E, Macarri G, et al. The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I), TIMP-1 and MMP-2. *Dig Liver Dis* 2004;36(11):744-751

26 Park HS, Bao L, Kim YJ, et al. Pirfenidone suppressed the development of glomerulosclerosis in the FGS/Kist mouse. *J Korean Med Sci* 2003;18(4):527-533

27 Shimizu T, Kuroda T, Hata S, et al. Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the post-obstructed kidney. *Kidney Int* 1998;54(1):99-109

28 Dosanjh A. Pirfenidone: a novel potential therapeutic agent in the management of chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 2007;39(7):2153-2156

29 Dosanjh A. Pirfenidone: anti-fibrotic agent with a potential therapeutic role in the management of transplantation patients. *Eur J Pharmacol* 2006;536(3):219-222

30 Zhang S, Shiels IA, Ambler JS, et al. Pirfenidone reduces fibronectin synthesis by cultured human retinal pigment epithelial cells. *Aust N Z J Ophthalmol* 1998;26:S74-S76

31 Lin X, Yu M, Wu K, et al. Effects of pirfenidone on proliferation, migration, and collagen contraction of human tenon's fibroblasts in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(8):3763-3770

32 Zhong H, Sun G, Lin X, et al. Evaluation of pirfenidone as a new postoperative anti-scarring agent in experimental glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(6):3136-3142

33 Yang Y, Ye Y, Lin X, et al. Inhibition of pirfenidone on TGF-beta2 induced proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of human lens epithelial cells line SRA01/04. *PLoS ONE* 2013;8(2):e56837

34 王晶,余敏斌.吡非尼酮抑制体外培养 RPE 细胞迁移、分化、增殖的研究.广州:中山大学 2011;1-64