

曲古抑菌素 A 对兔眼滤过术后滤过泡作用的研究

李晓艳, 邓颖, 杨建刚

基金项目:陕西省教育厅专项科研计划项目(No. 2013JK0785)
作者单位:(710077) 中国陕西省西安市,西安医学院第一附属医院眼科
作者简介:李晓艳,在职硕士研究生,主治医师,研究方向:青光眼、小儿斜视与弱视。
通讯作者:杨建刚,博士,研究方向:青光眼. jgyaang0077@gmail.com
收稿日期:2014-05-26 修回日期:2014-08-22

Effects of applying trichostatin A on filtration bleb after filtering surgery in rabbits

Xiao-Yan Li, Ying Deng, Jian-Gang Yang

Foundation item: Special Science and Technology Plan Project of Shaanxi Province (No. 2013JK0785)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jian-Gang Yang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China. jgyaang0077@gmail.com

Received: 2014-05-26 Accepted: 2014-08-22

Abstract

• AIM: To observe the morphologic changes of of filtration blebs after trichostatin A treatment in an experimental glaucoma filtration surgery (GFS).

• METHODS: Subconjunctival injection TSA, mitomycin C (MMC) and PBS during the filtering surgery in rabbits. The morphologic changes of filtration blebs were evaluated by Krofeld score method postoperatively days 3, 7, 14, 21, and 28.

• RESULTS: TSA induced filteation blebs were elevated diffusely within 14d and cystic blebs formed 28d, filtration bleb score was significantly higher in TSA group than that in PBS group.

• CONCLUSION: TSA can keep the aqueous humor outflow by inhibiting scar formation and prolong the existence of the filtration bleb.

• KEYWORDS: histone deacetylase inhibitor; trichostatin A; filtration surgery; filtration bleb; mitomycin C

Citation: Li XY, Deng Y, Yang JG. Effects of applying trichostatin A on filtration bleb after filtering surgery in rabbits. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(10):1776-1778

摘要

目的:观察曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)作用于兔眼滤过术后滤过泡的形态变化,研究其对术后结膜瘢痕的抑制作用。

方法:兔眼滤过术中结膜下注射 TSA、丝裂霉素 C(MMC)、PBS,分别于术后 3,7,14,21,28d 应用 Krofeld 评分评价滤过泡的形态变化。

结果:TSA 组 14d 内滤过泡弥漫性隆起,28d 囊性泡形成。术后 14,21d TSA 组滤过泡评分高于 PBS 组,具有统计学差异($P < 0.05$)。

结论:TSA 能够抑制术后结膜瘢痕形成,延长滤过泡存在时间,保持滤过道通畅。

关键词:组蛋白去乙酰化酶抑制剂;曲古抑菌素 A;滤过术;滤过泡;丝裂霉素 C

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.10.09

引用:李晓艳,邓颖,杨建刚.曲古抑菌素 A 对兔眼滤过术后滤过泡作用的研究. *国际眼科杂志* 2014;14(10):1776-1778

0 引言

青光眼滤过术后结膜的愈合反应是手术失败的主要原因,最多见的是成纤维细胞增殖和结膜纤维化,巩膜上的成纤维细胞增殖导致瓣的封闭和滤过泡的失败。术后早期(14d 内)进行干预调控是建立通畅的滤过通道、减少术后瘢痕形成的关键^[1-3]。研究发现,组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂可抑制正常成纤维细胞胶原合成^[4,5]。HDAC 抑制剂可以通过抑制 HDAC 的作用,使异常增殖的细胞生长停滞,诱导其凋亡^[6,7]。曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)是一种 HDAC 抑制剂,属于羟肟酸类化合物,主要抑制 I 型和 II 型 HDAC 的表达,选择性的改变凋亡基因和抗凋亡基因转录水平的表达,起到抑制细胞生长的作用,其中包括活化 p27。本研究通过 TSA 注入兔青光眼滤过术 Tenon 囊,研究其对术后滤过泡增殖的抑制作用,以期为临床寻找一种可能更有效的滤过术后抗瘢痕形成的辅助药物。

1 材料和方法

1.1 材料 选取中国长耳白兔 9 只(由西安医学院附属医院中心实验室提供),雌雄不限,体质量 2.0 ~ 2.5kg。实验前检查双眼前节、眼底及眼压均正常,排除眼部和全身疾病。由同一术者完成手术。随机将实验动物分为 3 组,每组 3 只:实验组为 TSA 组,阳性对照组为丝裂霉素 C(mitomycin C, MMC)组、阴性对照组为 PBS 组。

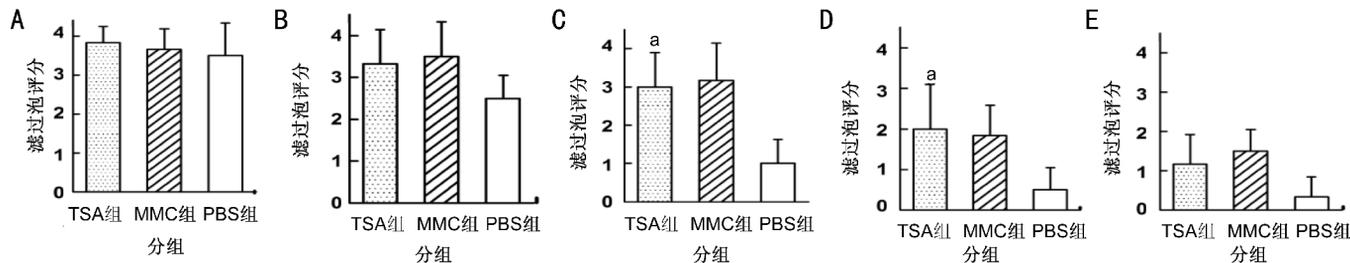


图1 各组术后滤过泡评分比较 A: 术后3d; B: 术后7d; C: 术后14d; D: 术后21d; E: 术后28d。^a $P < 0.05$ vs PBS组。

1.2 方法 所有实验兔麻醉后,做以角膜缘为基底的三角形板层巩膜瓣,前房穿刺后剪除后唇深层角巩膜组织约1.5mm×2.0mm,切除周边虹膜,6-0尼龙线间断缝合巩膜瓣顶端。球结膜复位。将600nmol/L TSA、0.4g/L MMC、PBS随机等量注射入兔眼术区结膜下。术后观察有无前房出血、结膜炎、滤过泡瘘、角膜上皮缺损等并发症。分别于术后3,7,14,21,28d通过裂隙灯显微镜观察滤过泡形态,应用Krofeld评分法评价并记录:1分:滤过泡扁平,无微囊,结膜厚,明显血管增生;2分:滤过泡轻度隆起,有微囊存在,结膜较厚,轻度血管增生;3分:滤过泡中度隆起,结膜较薄;4分:滤过泡明显隆起,结膜薄。

统计学分析:采用SPSS 13.0及Prism 5.0统计软件进行统计分析,实验结果以均数±标准差表示,均数间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 滤过术后并发症的比较 所有术眼术后均有不同程度前房纤维素性渗出少许,多于术后7d内吸收。TSA组、MMC组和PBS组未见结膜坏死,伤口愈合良好,未见结膜瓣渗漏,无浅前房,MMC组出现1例角膜上皮缺损。

2.2 滤过泡形态学变化 术后3d,各组均可形成弥散、隆起的滤过泡;TSA组、MMC组术后14d内滤过泡隆起其后滤过泡局限化,隆起度下降,逐渐变小,至28d评分主要为1分;PBS组至14d滤过泡接近扁平,21d几乎完全消失,滤泡评分为0。与PBS组比较,TSA组术后14,21d滤过泡评分均增高,具有统计学差异($P < 0.05$)。TSA组与MMC组各时点无统计学差异($P > 0.05$),见图1。

3 讨论

青光眼滤过性手术仍然是治疗青光眼的主要方法之一,形成具有良好形态和功能的滤过泡是抗青光眼滤过术成功的关键,但术后随访发现滤过泡纤维过度增殖致使滤过道瘢痕化和结膜下滤过泡空间被纤维组织填充,最终导致滤过手术失败^[8,9]。瘢痕的形成与术区成纤维细胞的增殖有关,术后滤过泡形成并维持,说明青光眼术后房水流出通畅,术区结膜下少有成纤维细胞增殖,未形成瘢痕^[10]。应用5-FU、MMC等抗代谢药物可有效抑制成纤维细胞增殖,防止瘢痕形成,但会导致明显并发症:如滤过泡瘘、伤口不良愈合及角膜损伤等^[11-13]。

组蛋白乙酰化酶(Histone transferases, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylases, HDACs)通过协同作

用影响基因表达,调控失衡导致细胞增殖、凋亡、迁移、血管化、纤维化和免疫反应等^[14]。研究表明,HDAC抑制剂通过不同的机制参与抑制多种组织和器官纤维化的进程。例如:HDAC抑制剂可上调p21, p27蛋白表达,下调细胞周期检测点激酶(Chk1)和抗凋亡蛋白Bcl-2,促使非小细胞肺癌细胞的凋亡^[15]。TSA源自链霉菌代谢产物,作为HDAC抑制剂的经典药物之一,纳摩尔水平的TSA就可以特异性地抑制HDAC的活性,引起多种哺乳动物细胞乙酰化组蛋白聚集,对细胞尤其是肿瘤细胞的增殖和凋亡起调控作用。另有研究将TSA作用于体外培养的兔角膜成纤维细胞,发现低剂量TSA对正常的角膜成纤维细胞的毒性较小,且有抑制角膜成纤维细胞合成的作用^[16]。

本课题组研究也发现在兔青光眼滤过术模型中将Ad-p27导入Tenon囊,实验观察p27表达增加抑制Tenon囊成纤维细胞增殖,降低Cdk2和Cdk4活性,从而抑制术后滤过泡瘢痕的形成^[13,17]。

目前TSA在抗肿瘤、调节免疫等方面的研究较多,但是应用于抗青光眼术后抑制结膜瘢痕形成的研究在国内外仍较少见,TSA是否对GFS滤过泡增殖有抑制作用?本实验通过TSA结膜下注射观察兔眼滤过术后滤过泡形态,若滤过泡扁平、血管化、瘢痕形成,认为滤过术失败。我们研究发现TSA组青光眼滤过术后14d内可形成隆起、弥散的滤过泡腔,评分主要为4分,而PBS组至14d滤过泡扁平乃至完全消失,滤过泡评分主要为1分,且血管增生明显。相较于PBS组滤过泡失败后,其仍能保持外引流功能,与MMC组基本相似。

实验中未能发现各组在并发症发生概率上存在差异。MMC是由头状链霉菌产生的乙撑亚胺类抗生素,可与DNA分子双螺旋形成交联,破坏DNA的结构和功能,抑制增殖期DNA复制。研究表明0.4g/L MMC术中一次性应用,可有效抑制兔眼术后不同滤过区域的成纤维细胞增殖。同时也发现由于MMC对睫状体毒性作用,使睫状体上皮功能减退,房水分泌减少,易导致术后浅前房,还可发生滤过泡渗漏,低眼压以及角膜毒性等严重并发症,这在以往的研究中已得到证实。而TSA在已开展的多种肿瘤治疗中,显示出毒副作用小、耐药性好、使用剂量低等优点^[18],在对体外培养的兔角膜成纤维细胞试验中也发现低剂量TSA对正常的角膜成纤维细胞的毒性较小。由于我们实验样本量小,其次我们选取浓度较为适中的

600nmol/L TSA,可能导致不能够很好地反映术后并发症情况。这需要我们扩大实验样本,选择不同浓度 TSA 进一步实验,才能真正反映术后并发症发生情况。

总之,实验结果提示 TSA 可使滤过泡形成良好,延长功能性滤过泡存在时间,能够有效抑制兔眼滤过术后成纤维细胞的增殖,防止滤过泡瘢痕化,维持滤过泡的形态与功能。在抑制青光眼术后滤过泡瘢痕化辅助治疗方面,可能成为新型、高效、低毒副作用的抑制成纤维细胞增殖的药物,具有潜在的应用价值。由于兔眼伤口愈合反应比较活跃与人眼存在差异,不同浓度 TSA 对成纤维细胞增殖能力抑制作用的差异以及 TSA 抑制术后滤过泡瘢痕形成的机制,还需要进一步实验研究探讨。

参考文献

1 Li Z, Tine VB, Sara VV, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(11):5217-5225

2 Min J, Lukowski ZL, Levine MA, et al. Comparison of single versus multiple injections of the protein saratin for prolonging bleb survival in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(12):7625-7630

3 裴澄,柴新红,孙梅. 青光眼滤过性术后环孢素 A 缓释系统抗增殖的实验研究. *国际眼科杂志* 2008;8(5):890-892

4 Rombouts K, Niki T, Greenwel P, et al. Trichostatin A, a histone decetylase inhibitor, suppresses collagen synthesis and prevents TGF-beta (1)-induced fibrogenesis in skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 2002;278(2):184-197

5 Ghosh AK, Mori Y, Dowling E, et al. Trichostatin A blocks TGF-beta-induced collagen gene expression in skin fibroblasts; involvement of Sp1. *Biophys Res Commun* 2007;354(2):420-426

6 Venugopal B, Evans TR. Developing histone deacetylase inhibitors as anti-cancer therapeutics. *Curr Med Chem* 2011;18(11):1658-1671

7 Thurn KT, Thomas S, Moore A, et al. Rational therapeutic

combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol* 2011;7(2):263-283

8 Khaw PT, Chang L, Wong TT, et al. Modulation of wound healing after glaucoma surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12(2):143-148

9 Collignon NJ. Wound healing after glaucoma surgery: how to manage it? *Bull Soc Belge Ophthalmol* 2005;29(5):55-59

10 李岱,李青春,孙明,等. 汉防己甲素滴眼液抗兔眼滤过术区纤维化的疗效观察. *眼科新进展* 2011;31(9):829-832

11 杨建刚,邓颖,周凌霄,等. 外源性 p27^{kip1} 对兔眼滤过术后结膜瘢痕的抑制作用. *西安交通大学学报(医学版)* 2012;33(4):478-481

12 Wong TT, Mead AL, Khaw PT. Prolonged antiscarring effects of ilomastat and MMC after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(6):2018-2022

13 Yang JG, Sun NX, Cui LJ, et al. Adenovirus-mediated delivery of p27 (KIP1) to prevent wound healing after experimental glaucoma filtration surgery. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30(4):413-423

14 Liu H, Wu H, Wang Y, et al. Inhibition of class II histone deacetylase blocks proliferation and promotes neuronal differentiation of the embryonic rat neural progenitor cells. *Acta Neurobiol Exp(Wars)* 2012;72(4):365-376

15 Platta CS, Greenblatt DY, Kunnimalalyaan M, et al. The HDAC inhibitor trichostatin A inhibits growth of small cell lung cancer cells. *J Surg Res* 2007;142(2):219-226

16 Sharma A, Mehan MM, Sinha S, et al. Trichostatin a inhibits corneal haze in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(6):2695-2701

17 Yang JG, Deng Y, Zhou LX, et al. Overexpression of CDKN1B inhibits fibroblast proliferation in a rabbit model of experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(1):343-352

18 Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, et al. HDACi: cellular effects, opportunities for restorative dentistry. *J Dent Res* 2011;90(12):1377-1388