

# 壳聚糖抑制兔外伤性增生性玻璃体视网膜病变的作用\*

冯 熠<sup>1</sup>, 王万辉<sup>2</sup>

## Chitosan inhibits traumatic proliferative vitreoretinopathy in rabbits

Feng Yi<sup>1</sup>, Wang Wan-hui<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** The research has found that chitosan can inhibit the scar formation in glaucoma surgery. However, there is not yet a clear report whether chitosan can prevent and slow the formation of proliferative vitreoretinopathy (PVR).

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of chitosan on traumatic PVR in rabbits and its mechanism.

**METHODS:** Rabbit traumatic PVR model was made by intravitreal injection of platelet-rich plasma. Subsequently, the rabbit vitreous body received an intravitreal injection of 0.1 mL normal saline, 5%, 10% and 15% chitosan. The preventive and therapeutic effect of chitosan on traumatic PVR was examined at different time points.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In the control group, the retina was detached after 10 days; the PVR had progressed to high stage over time. In chitosan group, the PVR also developed; however, the severity of PVR in chitosan group was lower than that in control group. The clinical grading of traumatic PVR in 10% and 15% chitosan group was significantly lower than that in the control group at 5 days after injection ( $P < 0.05$ ). Histological examination showed that there was no obvious morphological change of the retina in chitosan group. Intravitreal injection of chitosan is a safe and effective mean to reduce the development of traumatic PVR.

Feng Y, Wang WH. Chitosan inhibits traumatic proliferative vitreoretinopathy in rabbits. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(8): 1341-1344. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 在眼科领域, 已发现壳聚糖可以抑制青光眼手术瘢痕形成, 但还未有明确的报道可以阻止和减缓增生性玻璃体视网膜病变的发生。

**目的:** 观察壳聚糖对兔外伤性增生性玻璃体视网膜病变的防治作用及作用机制。

**方法:** 用自体富含血小板血浆玻璃体内注射制备兔外伤性增生性玻璃体视网膜病变模型, 并同时将生理盐水、5%壳聚糖、10%壳聚糖和 15%壳聚糖溶液 0.1 mL 注入兔眼玻璃体内, 在不同时间点观察壳聚糖对增生性玻璃体视网膜病变形成的防治作用。

**结果与结论:** 对照组第 10 天就出现视网膜脱离, 增生性玻璃体视网膜病变随着时间延长发展至更严重等级。壳聚糖组也发生增生性玻璃体视网膜病变, 但其严重程度均低于对照组。10%和 15%壳聚糖组给药 5 d 后, 增生性玻璃体视网膜病变的临床分级显著低于对照组( $P < 0.05$ )。组织学检查壳聚糖组未发现明显视网膜形态改变。结果说明壳聚糖玻璃体腔内注射是安全的, 并能有效抑制兔外伤性增生性玻璃体视网膜病变的发生发展。

**关键词:** 壳聚糖; 增生性玻璃体视网膜病变; 外伤性; 自体富含血小板血浆; 兔

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.08.003

冯熠, 王万辉. 壳聚糖抑制兔外伤性增生性玻璃体视网膜病变的作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(8):1341-1344. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是许多眼部疾病常见的并发症, 有着非常复杂的病理生理过程。虽然玻璃体手术是治疗该类疾病的有效手段, 但术后仍有部分患眼发生再增殖, 因此药物防治 PVR 具有非常重要的意义。关于 PVR 的药物防治研究有很多, 但大多局限于一些抗肿瘤的藥物, 如 5-Fu、柔红霉素、红比霉素及阿霉素等<sup>[1]</sup>, 因药物具有细胞毒性, 未在临床上推广应用。

壳聚糖是自然界唯一一种表面带有多价阳离子的天然高分子材料<sup>[2]</sup>, 其生物学特性优良, 具有抗微生物活性、止血、调节机体免疫功能

及抗肿瘤、调节胆固醇代谢、降血压及降血糖、促进伤口愈合、抑制瘢痕形成等作用<sup>[3-4]</sup>, 已广泛用于制造人工皮肤、可吸收缝线、止血材料、抗粘连剂、药物载体等<sup>[5]</sup>。

壳聚糖作为一种纯生物提取物, 其安全性及眼内相容性已有文献报道<sup>[6]</sup>, 并已证明具有选择性抑制纤维细胞生长增殖的特性<sup>[7]</sup>。可用于治疗眼组织纤维化疾病, 如增生性玻璃体视网膜病变, 外伤性牵引性视网膜脱离、后发性白内障等<sup>[8]</sup>。本实验观察壳聚糖防治兔外伤性 PVR 的作用。

## 1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

<sup>1</sup>Shanxi Eye Hospital, Taiyuan 030002, Shanxi Province, China; <sup>2</sup>Second Affiliate Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030002, Shanxi Province, China

Feng Yi, Associate chief physician, Shanxi Eye Hospital, Taiyuan 030002, Shanxi Province, China  
fengxininer@163.com

Supported by: Key Project of Science and Technology of Shanxi Province, No.2006031093-2\*

Received: 2011-09-10  
Accepted: 2011-12-29

<sup>1</sup> 山西省眼科医院, 山西省太原市 030002; <sup>2</sup> 山西医科大学第二医院, 山西省太原市 030002

冯熠, 女, 1972 年生, 山西省太原市人, 汉族, 1995 年山西医科大学毕业, 副主任医师, 主要从事眼外伤及眼视光学方面研究。  
fengxininer@163.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2012)08-01341-04

收稿日期: 2011-09-10  
修回日期: 2011-12-29  
(20110610009/M · C)

**时间及地点:** 实验于2004-08/2005-01在北京大学眼科中心眼科实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 健康成年灰兔24只, 体质量2.0~3.0 kg, 雌雄兼用, 由北京大学眼科中心实验室提供。

**主要试剂:** 壳聚糖, 相对分子质量100 000, 脱乙酰度75%, 由中国科学院兰州化学物理研究所提供。0.5%的卡因溶液、复方新霉素眼液和复方托品酰胺眼液购自北京大学第三医院药剂科。

**实验仪器:** WT-3型眼底照相仪为TOPCON公司产品。

**实验方法:**

**富含血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)制备<sup>[9]</sup>:** 以5 mL注射器分别抽取每只实验兔股动脉血5 mL, 1 500 r/min离心5 min, 制备富含血小板的血浆, 血小板计数器测定血浆中血小板数量为 $2.24 \times 10^8 \sim 2.71 \times 10^8 L^{-1}$ 。

**外伤性PVR模型的制作<sup>[10]</sup>:** 成年灰兔24只, 以1%的托品酰胺充分散瞳, 氯胺酮50 mg/kg、安定2 mg/kg肌肉注射, 用0.5%的卡因表面麻醉, 生理盐水充分冲洗结膜囊。每只兔右眼做为实验眼。用5号针头行前房穿刺, 放出适量房水; 于颞上方角膜缘后2 mm处用剃须刀刺向玻璃体中心部; 勿伤及晶状体及周边视网膜, 用剪刀向两侧扩大切口, 伤口与视网膜平行, 达8 mm, 轻压眼球将脱出的玻璃体剪除, 用8-0尼龙线间断缝合切口, 检查眼底排除眼内出血及视网膜脱离。用1 mL注射器分别抽取同一只兔制备的血浆0.4 mL注入玻璃体内制备眼外伤性PVR模型。

**动物分组及干预:** 24只动物随机分为4组, 每组6只, 造模同时给予生理盐水或不同浓度壳聚糖溶液。对照组: 玻璃体腔注射0.1 mL生理盐水; 5%壳聚糖组: 玻璃体腔注射5%壳聚糖0.1 mL; 10%壳聚糖组: 玻璃体腔注射10%壳聚糖0.1 mL; 15%壳聚糖组: 玻璃体腔注射15%壳聚糖0.1 mL。

**术后处理:** 术毕结膜下注射庆大霉素加地塞米松0.5 mL, 术后每天点复方新霉素和托品酰胺。

**临床观察:** 术后 1, 3, 5, 7, 10, 14, 28, 35 d 在充分散瞳的情况下用直接检眼镜检查眼底情况, 必要时进行眼底照相。

**PVR分级:** PVR的分级采用 Fastenberg等<sup>[11]</sup>的分级方法。0级, 玻璃体内细胞团; I级, 玻璃体中膜形成; II级, 局限性牵拉, 血管抬高、扭曲; III级, 局部髓线脱离; IV级, 广泛的视网膜脱离, 髓线全部脱离, 周边视网膜脱离; V级, 全部视网膜脱离, 视网膜皱褶和裂孔出现。记录每次检查的结果, 并计算每组眼PVR的平均分级。

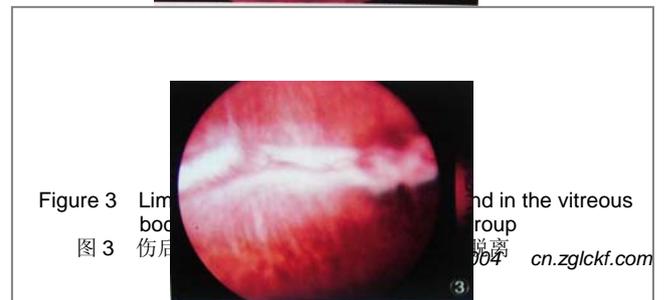
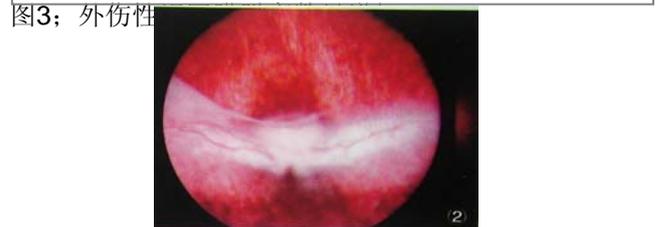
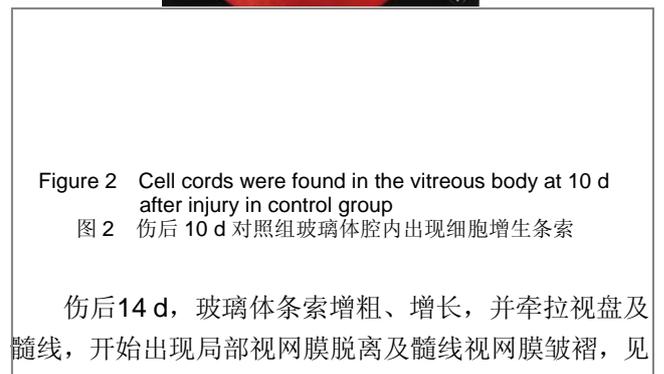
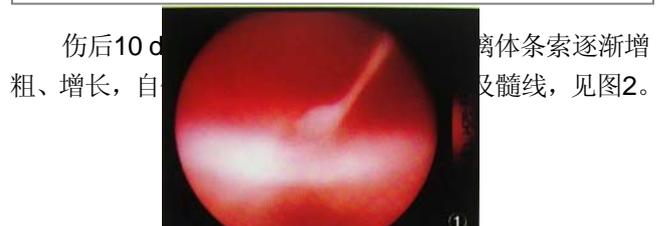
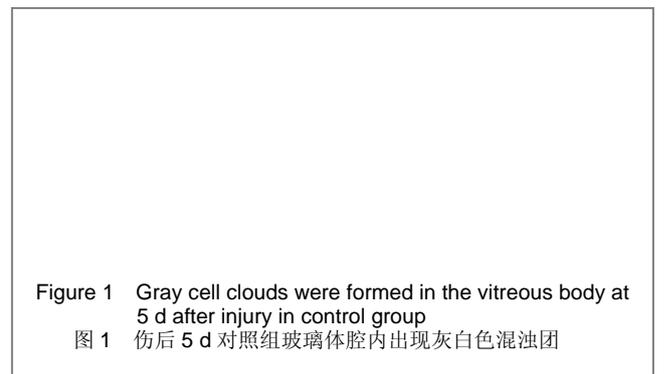
**主要观察指标:** 术后不同时间段玻璃体视网膜改变情况。

**统计学分析:** 配伍组的多个样本比较行秩和检验,  $P < 0.05$ 作为显著标准。使用 SPSS10.0统计学软件处理。

**2 结果**

**2.1 实验动物数量分析** 所有实验动物在实验观察期间均能健康成活, 进食及精神状态正常。结膜及角膜上皮无溃疡、糜烂缺损。

**2.2 临床观察** 对照组模型制备后玻璃体腔内立即出现灰白色混浊团, 混浊与伤道相连。伤后5 d, 玻璃体混浊加重, 范围扩大, 见图1。



伤后28 d后视网膜出现裂孔, 见图4。

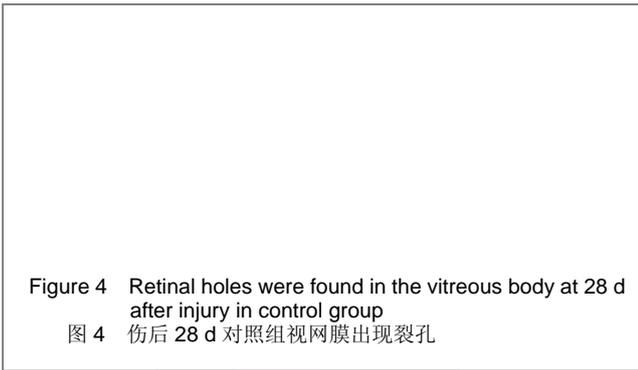


Figure 4 Retinal holes were found in the vitreous body at 28 d after injury in control group  
图4 伤后28 d对照组视网膜出现裂孔

5%壳聚糖组与对照组相比差异无显著性意义(秩和检验,  $P=0.2$ )。

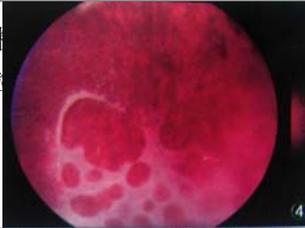


表1 各观察时间点对照组的PVR分级  
Table 1 Observation of proliferative vitreoretinopathy grading in control group at different time

Grading	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	28 d	35 d
0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	3	4	3	2	1	0	0	0
II	0	1	2	3	3	2	2	1
III	0	0	0	0	1	2	1	0
IV	0	0	0	0	0	2	2	3
V	0	0	0	0	0	0	1	2

表2 各观察时间点5%壳聚糖组的PVR分级  
Table 2 Observation of proliferative vitreoretinopathy grading in 5% chitosan group at different time

Grading	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	28 d	35 d
0	2	1	1	0	0	0	0	0
I	4	4	3	3	2	0	0	0
II	0	1	2	3	3	3	2	1
III	0	0	0	0	1	1	1	1
IV	0	0	0	0	0	2	2	2
V	0	0	0	0	0	0	1	2

10%壳聚糖组和15%壳聚糖组PVR的分级见表3、4。

表3 各观察时间点10%壳聚糖组的PVR分级  
Table 3 Observation of proliferative vitreoretinopathy grading in 10% chitosan group at different time

Grading	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	28 d	35 d
0	4	3	3	1	1	1	2	2
I	2	3	2	4	1	2	1	2
II	0	1	1	0	3	2	2	1
III	0	0	0	1	1	0	0	0
IV	0	0	0	0	0	1	1	1
V	0	0	0	0	0	0	0	0

在1 d和3 d, 所有组之间差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。然而在10%壳聚糖组和15%壳聚糖组中, 给药5 d后PVR的临床分级显著低于对照组(秩和检验,  $P < 0.05$ )。并且10%壳聚糖组和15%壳聚糖组的玻璃体视网

膜增生程度相似。10%的壳聚糖组和15%的壳聚糖组在28 d和35 d分别有1只和2只眼发展至牵引性视网膜脱离, 发生数量和对照组相比差异均有显著性意义( $\chi^2$ 检验,  $P=0.037$ 和 $P=0.029$ )。

表4 各观察时间点15%壳聚糖组的PVR分级  
Table 4 Observation of proliferative vitreoretinopathy grading in 15% chitosan group at different time

Grading	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	28 d	35 d
0	3	2	2	2	2	2	2	2
I	3	3	2	1	1	0	1	1
II	0	1	2	3	2	2	0	1
III	0	0	0	0	1	2	1	1
IV	0	0	0	0	0	0	2	1
V	0	0	0	0	0	0	0	0

### 3 讨论

PVR模型的建立方法有很多种。1979年Cleary等首先在兔眼成功制成外伤性PVR模型, 研究者在兔平坦部造成8 mm切口, 并向玻璃体注入自身全血。此后惠延年等<sup>[12]</sup>也用上述方法制造了兔外伤性PVR模型。梁厚成等<sup>[13]</sup>在以上动物模型基础上, 向兔玻璃体腔内注入PRP, 而不是自体全血, 复制出了外伤性PVR动物模型。作者在以前研究的基础上成功制备了兔外伤性PVR模型, 牵引性视网膜脱离发生率较高, 在28 d时为66.7%, 在35 d时为83.3%, 病理检查对照组玻璃体视网膜增生明显, 自伤口长入粗大的纤维膜, 主要是成纤维样细胞和胶质细胞。由于血小板是一种无分裂活性即不增生的细胞, 它含有很多生长因子及化学介质, 所以这种模型所观察到的增生细胞均是内源性的。本模型的特点是接近外伤的实际情况, 克服了单纯注入血小板引起的免疫反应不足, 避免了向玻璃体内注射培养细胞所致的玻璃体内增生细胞来源判定困难的问题, 同时该模型还避免了注血模型的不足, 在整个实验中始终可以观察眼底。

外伤性PVR是指发生在眼球穿孔伤后因创伤修复的过度瘢痕化所引起的牵引性视网膜脱离。在炎症刺激下的纤维组织增生和玻璃体或视网膜在伤口的嵌顿, 是主要的发病机制<sup>[14]</sup>。

由于PVR手术后视力很差, 大部分患者术后视力不及0.2, 还有10%~30%的患者视网膜脱离复发, 所以许多学者转向研究其药物治疗。以往的研究发现抗炎药地塞米松和抗代谢药道诺霉等可以不同程度地降低实验性PVR的发生率, 但是眼内使用作用点不明。PVR是以时相为特征的发展过程, 使它们均难以持续给药, 并且其固有的毒作用对无再生能力的神经细胞的损害不能估计。因此寻找新的、有特异性的药物是目前PVR研究的方向。

壳聚糖作为眼用生物制剂, 几乎不含有蛋白质及其

他杂质, 从其生物学特性上来看, 引起的炎症反应很轻微<sup>[15]</sup>。本实验用兔血浆注入玻璃体内制备眼外伤模型, 分别注入10%壳聚糖及15%的壳聚糖, 证明可抑制玻璃体纤维增生, 减缓或阻止PVR的产生。

目前, 壳聚糖抑制细胞增生及玻璃体视网膜增生程度, 减少PVR发生率的作用机制还不清楚。作者推测可能通过以下途径: ①壳聚糖能促进和激活补体C5a——一种强的PMN趋化剂的产生和补充, 以加速体内实验性伤口的愈合<sup>[16]</sup>。壳聚糖还能诱导局部巨噬细胞增生, 并使其活性增强。Illum等<sup>[17]</sup>观察到在伤后6 d壳聚糖组肉芽组织含有的有丝分裂细胞明显多于对照组, 尤其在富含胶原的下层, 提示壳聚糖可加速纤维母细胞产生胶原。壳聚糖通过此途径促进创伤愈合, 从而终止由于伤口长期刺激引起的成纤维细胞异常增生, 使引起PVR的途径之一得以抑制。此外, 壳聚糖还有抗感染的作用, 避免由于炎症诱发持久的眼内细胞增生。但此途径不是壳聚糖抑制PVR的主要途径。②应用壳聚糖后, 在创伤的早期成纤维细胞的胶原合成增加, 但合成的胶原将很快被降解。过多的胶原可能被甲壳素诱导的炎症细胞如粒细胞、巨噬细胞及表皮细胞、纤维母细胞等分泌的胶原酶降解<sup>[18]</sup>。在后期壳聚糖还可使纤维母细胞的生长抑制<sup>[19]</sup>。通过此途径, 壳聚糖达到抑制或减缓PVR形成的目的。

壳聚糖作为一种纯生物提取物, 其安全性及眼内相容性已有文献报道。有作者在研究含壳聚糖植入物在眼部的作用时, 没有发现结膜充血、角膜水肿等眼部刺激症状, 对角膜内皮细胞活性、晶状体上皮、视网膜组织学形态均无明显影响<sup>[20]</sup>。作者也注意到5%壳聚糖组的PVR发生率超过50.0%, 与对照组之间差异无显著性意义。而在10%壳聚糖组和15%壳聚糖组中, 给药5 d后PVR的临床分级显著低于对照组, 说明10%及15%的壳聚糖能有效安全地防止实验性和外伤性PVR的发生。而10%壳聚糖组与15%壳聚糖组相比, 差异无显著性意义。故从最好疗效, 最低浓度的用药原则上讲, 推荐使用10%的壳聚糖抑制PVR的发生发展。

由于时间及其他原因, 本次实验没有进一步研究壳聚糖的药物代谢动力学及其作用机制等更深层次的研究。

#### 4 参考文献

[1] Yang JY,Wang XQ.Zhongguo Linchuang Yaolixue yu Zhilixue. 2009;14(11):1253-1258.  
杨靖亚,王晓霁. 羧甲基壳聚糖与阿霉素联合应用的体外抗肿瘤作用[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(11):1253-1258.

[2] Jumaa M, Furkert FH, Müller BW. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. Eur J Pharm Biopharm. 2002;53(1):115-123.

[3] Li ZQ,Li SL.Linchuang Yanke Zazhi. 2011;19(2):122-125.  
李哲青,李寿玲. 壳聚糖对兔青光眼滤过手术模型瘢痕形成的影响[J].临床眼科杂志,2011,19(2):122-125.

[4] Cheng X, Zhang F, Zhou G, et al. DNA/chitosan nanocomplex as a novel drug carrier for doxorubicin. Drug Deliv. 2009;16(3): 135-144.

[5] Liu XP, Zhou ST, Li XY, et al.Anti-tumor activity of N-trimethyl chitosan-encapsulated camptothecin in a mouse melanoma model. J Exp Clin Cancer Res. 2010;29:76.

[6] Li X, Radomski A, Corrigan OI,et al. Platelet compatibility of PLGA, chitosan and PLGA-chitosan nanoparticles. Nanomedicine (Lond). 2009;4(7):735-746.

[7] Lefler A, Ghanem A. Development of bFGF-chitosan matrices and their interactions with human dermal fibroblast cells. J Biomater Sci Polym Ed. 2009;20(10):1335-1351.

[8] Zhang J, Wang S. Topical use of coenzyme Q10-loaded liposomes coated with trimethyl chitosan: tolerance, precorneal retention and anti-cataract effect. Int J Pharm. 2009;372(1-2): 66-75.

[9] Jiang CH,Zhang MN,Zhang G.Zhonghua Yandibing Zazhi. 1999; 15(2):69-71.  
姜彩辉,张卯年,张颢. 维拉帕米防治外伤性增生性玻璃体视网膜病变的实验研究[J]. 中华眼底病杂志,1999,15(2):69-71.

[10] Cleary PE,Ryan SJ.Experimental posterior penetrating eye injury in the rabbit. I. Method of production and natural history,Br J Ophthalmol. 1979; 63(5): 306-311.

[11] Fastenberg DM, Diddie KR, Dorey K, et al. The role of cellular proliferation in an experimental model of massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol. 1982;93(5):565-572.

[12] Hui YN,Cai YS.Zhonghua Yandibing Zazhi. 1999;15(2):67-68.  
惠延年,蔡用舒.兔眼后节穿孔伤玻璃体纤维增生[J].中华眼底病杂志,1999,15(2):67-68.

[13] Liang HC,Hui YN,Cai YS.Zhonghua Yanke Zazhi. 1994;30(2): 122-125.  
梁厚成,惠延年,蔡用舒.去炎松预防实验性增殖性玻璃体视网膜病变[J].中华眼科杂志,1994,30(2): 122-125.

[14] Sugano M, Fujikawa T, Hiratsuji Y, et al.A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. Am J Clin Nutr. 1980;33(4): 787-793.

[15] Yang H, Wang R, Gu Q, et al. Feasibility study of chitosan as intravitreal tamponade material. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008;246(8):1097-1105.

[16] Slütter B, Soema PC, Ding Z,et al. Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen. J Control Release. 2010;143(2):207-214.

[17] Illum L, Farraj NF, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. Pharm Res. 1994;11(8):1186-1189.

[18] Hartmann V, Keipert S. Physico-chemical, in vitro and in vivo characterisation of polymers for ocular use. Pharmazie. 2000; 55(6):440-443.

[19] Felt O, Baeyens V, Buri P, et al. Delivery of antibiotics to the eye using a positively charged polysaccharide as vehicle. AAPS PharmSci. 2001;3(4):E34.

[20] Genta I, Conti B, Perugini P,et al. Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. J Pharm Pharmacol. 1997; 49(8):737-742.

#### 来自本文课题的更多信息一

**基金声明:** 山西省科技攻关项目(2006031093-2)。

**作者贡献:** 实验设计、资料收集、实施人员为第一作者和北京大学眼科中心实验室相关人员, 评估为第一、二作者等。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

**研究的创新之处与不足:** ①发现壳聚糖确实能有效安全地防止外伤性增生性玻璃体视网膜病变的发生。②在实验中没有形成精确的数据, 只是通过肉眼的观察进行分级, 主观性比较大。③统计中使用的秩和检验, 是一种较为粗略的检验方法。