

EDTA 的螯合作用在角膜研究中的应用进展

伍腾飞, 彭秀军

作者单位: (100048) 中国北京市, 海军总医院眼科
作者简介: 伍腾飞, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼科学。
通讯作者: 彭秀军, 男, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 眼科学。PXJ1@vip.sina.com
收稿日期: 2012-06-07 修回日期: 2012-09-10

Application progress of EDTA's chelation in cornea

Teng-Fei Wu, Xiu-Jun Peng

Department of Ophthalmology, Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Correspondence to: Xiu-Jun Peng. Department of Ophthalmology, Navy General Hospital, Beijing 100048, China. PXJ1@vip.sina.com
Received: 2012-06-07 Accepted: 2012-09-10

Abstract

• As an important metal ion chelator, ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) has been widely used in many fields of industrial, medical and biological engineering and so on. There were reports about EDTA being used to treat band keratopathy and some other ophthalmic diseases as early as the mid-20th century. And in the subsequent studies, researchers had discovered that the EDTA is a good penetration enhancer which can release the tight junctions between the corneal epithelial cells, and indirectly increase the transshipment of drugs to the cornea. Recently, the chelating function of EDTA has also been widely used for separating or extracting of corneal cells in biological engineering. The purpose of this paper is to review the applications of EDTA's chelation in the treatment of corneal diseases, the penetration of ophthalmic agents to cornea and the corneal biological engineering.

• KEYWORDS: ethylenediaminetetraacetic acid; cornea; corneal cells; tight junction

Citation: Wu TF, Peng XJ. Application progress of EDTA's chelation in cornea. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(10): 1890-1893

摘要

乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 作为一种重要的金属离子螯合剂, 已被广泛应用于工业、医疗、生物工程等诸多领域。早在 20 世纪中期就有 EDTA 用于

治疗带状角膜病变等眼部疾病的报道, 随后的研究中研究者们发现 EDTA 能够松解角膜上皮细胞间的紧密连接, 间接地增加药物向角膜内的转运, 是一种良好的渗透促进剂。如今, EDTA 这种松解细胞间紧密连接的功能在细胞工程中角膜细胞的分离提取也有着广泛应用。本文主要就 EDTA 在治疗角膜疾病、眼科药物的角膜渗透及角膜生物工程中的应用做一综述。

关键词: 乙二胺四乙酸; 角膜; 角膜细胞; 紧密连接

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.20

引用: 伍腾飞, 彭秀军. EDTA 的螯合作用在角膜研究中的应用进展. 国际眼科杂志 2012;12(10):1890-1893

0 引言

乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 作为一种金属离子螯合剂被广泛应用于生产生活中, 在眼科领域, 早期人们利用其螯合功能辅助清除沉积在角膜内的金属离子来治疗带状角膜病变、角膜碱烧伤、角膜血染等眼科疾病。一些连接蛋白如钙黏蛋白、紧密连接蛋白 ZO-1、连接蛋白 43 等在钙离子参与下共同构成了角膜细胞间的紧密连接。细胞间紧密连接这种特殊结构的存在构成了角膜对药物的屏障作用, 使得它们不能大量进入角膜基质或者穿过角膜进入前房^[1]。研究中人们发现 EDTA 能通过螯合组织中的 Ca²⁺ 破坏细胞间紧密连接完整性使之发生松解, 间接破坏了角膜的屏障作用, 而增加药物在角膜的渗透, 可能作为一种良好的渗透促进剂^[2]。随着研究的深入, EDTA 的螯合作用还常常被应用于生物工程中的角膜细胞分离提取等眼科基础研究领域。

1 角膜疾病的辅助治疗

1.1 钙化性带状角膜病变 钙化性带状角膜病变 (calcific band keratopathy, CBK) 常发生于慢性眼病或有钙、磷代谢紊乱的全身疾病后, 是一种以角膜浅层钙质沉着为主要病理改变的角膜变性, 病变进展常导致严重的视力损害, 许多晚期患者最终面临角膜移植^[3]。对该疾病的早期治疗迄今为止应用较为广泛的依然是 EDTA 螯合法^[3-6]。Najjar 等^[4]对 230 例 CBK 患者中的 54 例 65 眼患者进行了 EDTA 螯合治疗, 随访平均时间为 36.6mo, 其中 90% 的患者术后症状部分或完全减轻, 随访 1mo 后 33% 患眼视力提高了 2 行以上。该结果表明 EDTA 螯合法是一种有效改善 CBK 患者症状以及提高视力的方法, 并提示该疗法也可用于在早期药物治疗无效情况下 CBK 患者的继续治疗。由于单纯药物治疗并不能去除角膜前基质较为深在的钙斑, 且可能需要长期治疗, Kwon 等^[5]首次联合 EDTA、浅层角膜切削术和羊膜移植治疗 CBK, 其报道的 2

例患者术后症状和视力都有明显改善,之后,Im等^[6]联合EDTA、准分子激光光疗角膜切削术(PTK)和羊膜移植术(AMT)对10例CBK患者的11只患眼进行治疗,亦取得了一定效果,术后随访未出现并发症和复发现象,提示该方法可用于钙质沉积较深的CBK患者。许懋等^[7]对6例7眼眼内硅油填充术后带状角膜变性患者实施EDTA螯合联合PTK及羊膜移植术治疗,术后结果证实该方法有效。由此我们不难得出尽管治疗CBK的方法不断改进,但EDTA作为螯合剂在治疗CBK的过程中仍然起到了主导作用。

1.2 角膜铁质沉着症及角膜血染 角膜铁质沉着症主要由铁质异物长期残留于角膜所致,其浸润多局限在浅层角膜,浸润严重或处理不当亦会对患者视力造成不同程度的影响。角膜血染是外伤性前房积血的一种并发症,多因外伤性前房积血伴有严重角膜内皮损伤,含铁血黄素在角膜基质中沉积所致,若病程中血染不能吸收,最终可能严重影响患者视力。EDTA作为金属离子螯合剂,与铁离子结合后同样能形成稳定的螯合物,利于清除组织中的铁离子,因此在铁质异物取出后可较长期应用EDTA滴眼液,以使残余铁离子排出^[8]。临床上有报道使用2%EDTA-NA滴眼液处理角膜异物取出后铁锈斑^[9],刘淑芳等通过研究发现应用0.37%EDTA联合几丁糖凝胶能有效析出角膜血染中铁离子,该结果提示0.37%EDTA联合几丁糖凝胶可能作为治疗角膜血染的有效制剂^[10],根据这一原理,EDTA也常被用于其他金属离子角膜沉着症,如铜质沉着症等。

1.3 角膜碱烧伤 眼部碱烧伤是常见的职业性眼外伤,是致盲疾病之一。碱烧伤早期(24h内)主要为碱性物质对眼组织的直接腐蚀作用,而伤后3d至1wk左右是溃疡加深扩大与组织再生交替的病理生理过程,此时是角膜组织释放胶原酶的高峰。EDTA主要通过螯合胶原酶活性所必需的钙离子达到间接抑制胶原酶的作用,应用后能起到防止溃疡形成和角膜穿孔的功效,临床上0.5%EDTA滴眼液和EDTA亲水性软性角膜接触镜较为常用^[9]。

1.4 抑制细菌活性 在一些角膜感染性疾病的体外模型中,有学者证实EDTA能有效抑制铜绿假单胞菌活性,或联合苯扎氯铵(BAK)后能抑制金黄色葡萄球菌的活性,提示EDTA的抑菌作用可能与其金属离子螯合作用密切相关^[11,12]。

2 对药物在角膜的促渗作用

角膜作为眼科局部点药渗入眼内的主要门户,其基本结构包括上皮层、基质层和内皮层。脂质性的上皮细胞层被认为是角膜主要的渗透屏障,其特点在于上皮细胞表面间的一些连接蛋白如钙黏蛋白、紧密连接蛋白ZO-1、连接蛋白43等在钙离子的参与下构成的细胞间紧密连接,这些紧密连接尤其构成了对水溶性药物经细胞间旁路渗透的屏障^[1,13]。

许多研究表明,破坏上皮细胞间的紧密连接可以增加细胞间旁路对药物的通透性。EDTA作为一种金属离子螯合剂,能通过对钙离子的螯合作用破坏细胞间紧密连接的完整性,间接提高药物在角膜的渗透^[2]。早在20世纪

已有EDTA促进 β 受体阻滞剂、甘油、色甘酸等在角膜渗透的研究报道,近年来也有许多关于EDTA对眼用药物促渗作用的研究报道。Sasaki等^[14]报道了0.5%EDTA能促进促甲状腺激素释放激素(TRH)和促黄体激素释放激素(LHRH)在角膜的渗透。Kikuchi等^[15,16]报道在EDTA和硼酸的协同下通过增加胞膜脂质体的流动性促进了细胞间旁路对CS-088的渗透,其中CS-088是一种新型抗青光眼制剂,属于血管紧张素I型受体拮抗剂。Ahuja等^[17]通过研究发现在pH=7.4时0.01%EDTA能有效促进双氯芬酸在角膜的渗透。Pawar等^[2]通过研究pH=7.2时0.01%EDTA对莫西沙星在角膜的渗透作用,得出了相似结论。Rathore等^[18]的研究证实在0.01%EDTA与0.01%BAK联合使用时角膜表现出对加替沙星眼药水的最大渗透效应。在研究角膜对阿昔洛韦(ACV)的渗透中Majumdar等^[19]也发现BAK联合EDTA能有效促进ACV在角膜的渗透。为避免经典胶原交联法去角膜上皮引起的术后不良反应和并发症有研究者联合EDTA与BAK、EDTA与氨基丁三醇作为促渗剂来实现不去角膜上皮状态下促进核黄素向角膜基质的渗透,以开展跨角膜上皮胶原交联的研究,取得了一定效果^[20]。不仅EDTA对眼科药物表现出促渗作用,Tong等^[21]研究表明EDTA也通过改变细胞间的旁路促进了质粒-PM(质粒聚合微粒)在兔角膜的转运。

3 应用于角膜生物工程

在治疗一些眼科疾病、破坏角膜细胞间紧密连接完整性促进药物的角膜渗透方面,EDTA的离子螯合作用不可或缺,除了这些应用研究外,EDTA也被广泛应用于组织细胞生物工程等领域中。

3.1 作为工具试剂 在角膜细胞学研究中,EDTA常与胰蛋白酶一起被用作细胞裂解液的有效成分。Abrams等^[22,23]通过对猕猴和人角膜的体内实验发现经EDTA处理过的角膜组织在去上皮后,其基底膜仍能保持一定的完整性。Salvalaio等^[24]在研究角膜植片的制备和保存时发现,去角膜上皮过程中用胰蛋白酶-EDTA(Trypsin/EDTA)作预处理的方法能有效避免单纯机械去上皮所带来的上皮基底层和基质损伤。其机制与Trypsin/EDTA能选择性地消化参与上皮细胞间黏附和细胞外基质相互作用的整合素和钙黏蛋白有关。在Joyce等^[25]开展的一项角膜内皮细胞工程研究中0.02%EDTA被用来松解角膜内皮细胞间连接。Kim等^[26]用Trypsin/EDTA联合荧光激活细胞分选术的方法成功地从角膜缘组织中分离出了角膜上皮干细胞,提示该方法可应用于组织工程干细胞疗法的研究。在角膜上皮细胞分离提取、角膜内皮细胞分离、角膜缘干细胞分离等研究中EDTA也发挥了重要作用^[27-29]。

3.2 加速基因转导表达 虽然免疫赦免在角膜移植中起到了至关重要的作用,但导致同种异体角膜移植失败的重要原因仍然是免疫排斥反应。近年来,细胞因子IL-10在角膜移植中抑制免疫应答的作用备受关注,这种细胞因子可以由EB病毒的Bcfl1基因表达,且该病毒基因与人类的同源性高达71%,为此Tan等^[30]开展了转铁蛋白受体介导病毒IL-10基因向角膜内皮转染的研究,该研究发现

在病毒 IL-10 基因转染过程中采用 EDTA 干预后可使该基因在角膜内的转染效率提高近 3 倍,他们的研究结果还显示 EDTA 能增强转基因表达,有人认为可能与 EDTA 的螯合作用抑制了溶酶体中核酸酶和去氧核糖核酸酶活性相关,虽然 EDTA 的作用机制尚不十分明确,但他们的研究结果却为非病毒载体介导基因转染的可行性提供了一定的实验依据。

3.3 促进离体细胞增殖 角膜内皮层由一定数目贴附于角膜后弹力层的单层细胞构成,细胞与细胞间形成的离子泵和紧密连接构成了房水与角膜基质间的渗透屏障,在调节角膜基质的水化状态、维持角膜的透明和视觉功能的稳定中起着至关重要的作用,但是,角膜内皮细胞的数目常常会随着年龄增长或一些疾病的发生而减少,穿透性角膜移植或角膜内皮移植虽然能有效控制角膜内皮细胞数目的减少,但由于供体来源受限,使得这些治疗措施无法有效开展,通过研究,人们发现角膜内皮组织工程可能为这一问题的解决提供新的希望和路径^[31],EDTA 作为金属离子螯合剂在这些研究中发挥了不可或缺的作用。Li 等^[32]通过免疫组化方法研究发现经 Trypsin/EDTA 37℃ 下孵育 10min 后的人角膜内皮细胞(HCECs)在培养过程中表达了更多的细胞增殖相关核抗原 Ki67,证实 Trypsin/EDTA 短暂处理可以促进 HCECs 的增殖。Senoo 等^[33]在研究中发现经 0.2% EDTA 处理 60min 后人角膜内皮细胞增殖效果最佳,有近 16%~18% 的细胞发生了增殖,可能与细胞的接触抑制解除有关。Gao 等^[31]在研究中也得出 0.125% Trypsin/0.02% EDTA 的组合能有效分离角膜内皮细胞,且孵育后细胞形态可保持稳定。Joyce 等^[34]发现 EDTA 能通过松解鼠角膜内皮细胞间紧密连接,抑制一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 p27kip1 的表达,使细胞增殖得以进行。Joko 等^[35]也发现经含 EDTA 的培养基孵育 3h 后,参与培养中角膜内皮细胞增殖的转录抑制和细胞周期调节的早幼粒细胞白血病锌指蛋白(PLZF)表达下降了近 20 倍,而在用普通培养基取代含 EDTA 的培养基 24h 后 PLZF 的表达又开始上升,他们的研究表明 PLZF 的表达与角膜内皮细胞间连接密切相关,而正是 EDTA 破坏了细胞间的连接才促使 PLZF 的表达受阻,进而间接促进了细胞增殖。

4 结语

目前国内外对 EDTA 在眼科的应用和研究现状主要集中在其金属离子螯合作用。无论在治疗某些眼科疾病、增加角膜对药物渗透性还是组织细胞工程等方面,EDTA 以其金属离子螯合作用为实现这些临床应用和科学研究提供了重要帮助,并且,因为 EDTA 成本低廉,对眼部毒性作用小,经其干预后的角膜细胞形态仍能保持稳定,其应用也会越来越广泛^[31, 36, 37],但值得指出的是,在以上的应用和研究中 EDTA 发挥其最佳作用的浓度和作用时间等条件并不统一,并且,在促渗研究中,学者们发现 EDTA 的促渗作用并不能使所有水溶性药物在角膜的渗透都增加,而常常需要联合其他表面活性剂(如苯扎氯铵)来增加药物在角膜的渗透,其机制尚需研究。因此在明确其螯合作用的基础上进一步探讨各种自身或环境因素对 EDTA 发

挥其最佳效用的影响显得尤为重要,这将为阐明其作用机制,指导临床和科研中合理有效地应用 EDTA 提供有力依据。

参考文献

- 1 潘飞,姚玉峰.人角膜内皮细胞增殖特性及能力的研究进展.浙江大学学报(医学版) 2011;1:94-100
- 2 Pawar PK, Majumdar DK. Effect of formulation factors on *in vitro* permeation of moxifloxacin from aqueous drops through excised goat, sheep, and buffalo corneas. *AAPS Pharm Sci Tech* 2006;7(1):E13
- 3 Jhanji V, Rapuano CJ, Vajpayee RB. Corneal calcific band keratopathy. *Curr Opin Ophthalmol* 2011;22(4):283-289
- 4 Najjar DM, Cohen EJ, Rapuano CJ, et al. EDTA chelation for calcific band keratopathy: results and long-term follow-up. *Am J Ophthalmol* 2004;137(6):1056-1064
- 5 Kwon YS, Song YS, Kim JC. New treatment for band keratopathy: superficial lamellar keratectomy, EDTA chelation and amniotic membrane transplantation. *J Korean Med Sci* 2004;19(4):611-615
- 6 Im SK, Lee KH, Yoon KC. Combined ethylenediaminetetraacetic acid chelation, phototherapeutic keratectomy and amniotic membrane transplantation for treatment of band keratopathy. *Korean J Ophthalmol* 2010;24(2):73-77
- 7 许懋,杨安怀,陈震,等.乙二胺四乙酸螯合联合 PTK 及羊膜移植术治疗眼内硅油填充术后带状角膜变性的临床疗效观察.临床眼科杂志 2011;4:330-332
- 8 徐亮,吴晓,魏文斌.同仁眼科手册.第 2 版.北京:科学出版社 2011:547,552
- 9 闫淑芳.角膜铁锈斑环手术剔除的临床体会.黑龙江医学 2001;8:599
- 10 杨红,刘淑芳,陈芳.依地酸二钠-几丁糖凝胶对兔角膜血染铁离子析出的作用.眼外伤职业眼病杂志 2010;32(4):246-250
- 11 Dantas PE, Uesugui E, Nishiwaki-Dantas MC, et al. Antibacterial activity of anesthetic solutions and preservatives: an *in vitro* comparative study. *Cornea* 2000;19(3):353-354
- 12 Mannis MJ. The use of antimicrobial peptides in ophthalmology: an experimental study in corneal preservation and the management of bacterial keratitis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2002;100:243-271
- 13 Nakamura T, Yamada M, Teshima M, et al. Electrophysiological characterization of tight junctional pathway of rabbit cornea treated with ophthalmic ingredients. *Biol Pharm Bull* 2007;30(12):2360-2364
- 14 Sasaki H, Yamamura K, Mukai T, et al. Modification of ocular permeability of peptide drugs by absorption promoters. *Biol Pharm Bull* 2000;23(12):1524-1527
- 15 Kikuchi T, Suzuki M, Kusai A, et al. Synergistic effect of EDTA and boric acid on corneal penetration of CS-088. *Int J Pharm* 2005;290(1-2):83-89
- 16 Kikuchi T, Suzuki M, Kusai A, et al. Mechanism of permeability-enhancing effect of EDTA and boric acid on the corneal penetration of 4-[1-hydroxy-1-methylethyl]-2-propyl-1-[4-[2-[tetrazole-5-yl]phenyl]phenyl]methylimidazole-5-carboxylic acid monohydrate (CS-088). *Int J Pharm* 2005;299(1-2):107-114
- 17 Ahuja M, Dhake AS, Majumdar DK. Effect of formulation factors on *in vitro* permeation of diclofenac from experimental and marketed aqueous eye drops through excised goat cornea. *Yakugaku Zasshi* 2006;126(12):1369-1375
- 18 Rathore MS, Majumdar DK. Effect of formulation factors on *in vitro* transcorneal permeation of gatifloxacin from aqueous drops. *AAPS Pharm Sci Tech* 2006;7(3):57

- 19 Majumdar S, Hippalgaonkar K, Repka MA. Effect of chitosan, benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid on permeation of acyclovir across isolated rabbit cornea. *Int J Pharm* 2008;348(1-2):175-178
- 20 伍腾飞, 彭秀军. 跨角膜上皮核黄素-紫外线胶原交联的研究进展. *国际眼科杂志* 2012;12(6):1081-1084
- 21 Tong YC, Chang SF, Liu CY, et al. Eye drop delivery of nano-polymeric micelle formulated genes with cornea-specific promoters. *J Gene Med* 2007;9(11):956-966
- 22 Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF, et al. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res* 2000;299(1):39-46
- 23 Abrams GA, Schaus SS, Goodman SL, et al. Nanoscale topography of the corneal epithelial basement membrane and Descemet's membrane of the human. *Cornea* 2000;19(1):57-64
- 24 Salvalaio G, Fasolo A, Bruni A, et al. Improved preparation and preservation of human keratoplasty lenticules. *Ophthalmic Res* 2003;35(6):313-318
- 25 Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation; potential for use in regenerative medicine. *Cornea* 2004;23(Suppl 8):S8-S19
- 26 Kim MK, Lee JL, Shin KS, et al. Isolation of putative corneal epithelial stem cells from cultured limbal tissue. *Korean J Ophthalmol* 2006;20(1):55-61
- 27 Yuan J, Liang LL, Hu XQ, et al. Effects of pressure bionic culture on the morphology of corneal endothelium cells. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2011;47(4):347-352
- 28 Papini S, Rosellini A, Nardi M, et al. Selective growth and expansion of human corneal epithelial basal stem cells in a three-dimensional-organ culture. *Differentiation* 2005;73(2-3):61-68
- 29 Tan EK, He H, Tseng SC. Epidermal differentiation and loss of clonal growth potential of human limbal basal epithelial progenitor cells during intrastromal invasion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(7):4534-4545
- 30 Tan PH, King WJ, Chen D, et al. Transferrin receptor-mediated gene transfer to the corneal endothelium. *Transplantation* 2001;71(4):552-560
- 31 Gao Y, Zhou Q, Qu M, et al. In vitro culture of human fetal corneal endothelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(5):663-669
- 32 Li W, Sabater AL, Chen YT, et al. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(2):614-620
- 33 Senoo T, Obara Y, Joyce NC. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(10):2930-2935
- 34 Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium; contact inhibition and TGF-beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(7):2152-2159
- 35 Joko T, Nanba D, Shiba F, et al. Effects of promyelocytic leukemia zinc finger protein on the proliferation of cultured human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2007;13:649-658
- 36 Hitani K, Yokoo S, Honda N, et al. Transplantation of a sheet of human corneal endothelial cell in a rabbit model. *Mol Vis* 2008;14:1-9
- 37 Epstein SP, Ahdoot M, Marcus E, et al. Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25(2):113-119