

早期糖尿病 SD 大鼠玻璃体腔注射康柏西普对血液 VEGF 及炎症因子影响

符蓉¹ 刘颖² 于立宏² 张倩³ 吴月英³ 李艳春³ 裴存文^{2*}

1 承德医学院研究生院

2 承德市中心医院眼科

3 承德市中心医院重症医学科一病区

DOI:10.32629/bmtr.v8i1.18556

[摘要] 目的: 探讨糖尿病SD大鼠模型玻璃体腔注射康柏西普(KH902)后,全身血管内皮生长因子(VEGF)及炎症因子白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的短期动态变化及安全性。评估不同病程阶段对上述指标的影响。方法: 选取6周龄SD大鼠,随机分为正常组与糖尿病(DM)组。将建模成功的糖尿病SD大鼠和正常组大鼠根据病程及给药后取样时间分为6个亚组(6周正常/DM组24h、96h,8周正常/DM组96h),每组11只。随后将各亚组随机分为KH902组(n=6)与PBS组(n=5)。采用多因子检测试剂盒测定血清中VEGF、IL-6、IL-10、TNF- α 的平均荧光强度(MFI)。使用SPSS 27.0软件进行统计分析,P<0.05为差异有统计学意义。结果:DM组中,给药24h时,给药组血清IL-10水平高于PBS组(P<0.05)。KH902组不同给药时间比较,正常组表现为IL-6在24h时高于96h(P<0.05);DM组表现为IL-6和IL-10水平在24h时高于96h(P<0.05)。结论: 玻璃体腔注射KH902可在短期内调节糖尿病SD大鼠模型的血清IL-10和IL-6水平,而未引起VEGF、TNF- α 显著变化,提示其局部用药可能引起全身炎症调节效应,且短期安全性良好。此外,KH902的全身效应在本研究所涉及的不同病程阶段间未见显著差异,为糖尿病视网膜病变(DR)临床治疗的给药方案提供实验依据。

[关键词] 糖尿病; 糖尿病视网膜病变; 血液; VEGF; 炎症因子

中图分类号: R781.6+4 文献标识码: A

Effects of Intravitreal Conbercept Injection on Circulating VEGF and Inflammatory Cytokines in Early Diabetic SD Rats

Rong Fu¹ Ying Liu² Lihong Yu² Qian Zhang³ Yueying Wu³ Yanchun Li³ Cunwen Pei^{2*}

1 Graduate School, Chengde Medical University

2 Department of Ophthalmology, Chengde Central Hospital

3 First Ward of the Department of Intensive Care Medicine, Chengde Central Hospital

[Abstract] Objective: To investigate the short-term systemic changes and safety of vascular endothelial growth factor (VEGF) and inflammatory cytokines, including interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and tumor necrosis factor- α (TNF- α), following intravitreal injection of conbercept (KH902) in streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley (SD) rats, and to evaluate the influence of different disease durations on these parameters. Methods: Six-week-old SD rats were randomly divided into a normal control group and a diabetic mellitus (DM) group. Successfully established diabetic rats and normal rats were further stratified into six subgroups according to disease duration and post-injection sampling time (6-week normal/DM groups at 24 h and 96 h, and 8-week normal/DM groups at 96 h), with 11 rats per subgroup. Each subgroup was then randomly assigned to receive intravitreal injection of conbercept (KH902 group, n = 6) or phosphate-buffered saline (PBS group, n = 5). Serum levels of VEGF, IL-6, IL-10, and TNF- α were assessed using a multiplex immunoassay, and results were expressed as mean fluorescence intensity (MFI). Statistical analyses were

performed using SPSS version 27.0, with $P < 0.05$ considered statistically significant. Results: In the normal group, no significant differences were observed in serum IL-6, IL-10, TNF- α , or VEGF levels between the KH902 and PBS groups ($P > 0.05$). In the DM group, serum IL-10 levels were significantly higher in the KH902 group than in the PBS group at 24 h after injection ($P < 0.05$), whereas no significant differences were found for other cytokines ($P > 0.05$). At 96 h after injection, no significant differences were detected between the two groups for any measured parameter ($P > 0.05$). Time-point comparisons within the KH902-treated groups showed that serum IL-6 levels were significantly higher at 24 h than at 96 h in normal rats ($P < 0.05$), while both IL-6 and IL-10 levels were significantly higher at 24 h than at 96 h in diabetic rats ($P < 0.05$). No significant differences were observed between normal and diabetic rats at the same sampling time points, nor between different disease durations (6 vs. 8 weeks) ($P > 0.05$). Conclusions: Intravitreal injection of conbercept induces short-term modulation of serum IL-10 and IL-6 levels in early diabetic SD rats without significantly affecting circulating VEGF or TNF- α levels, suggesting a mild and transient systemic inflammatory regulatory effect with favorable short-term safety. Moreover, no significant differences in systemic effects were observed across different stages of early diabetes, providing experimental evidence for the systemic safety of intravitreal anti-VEGF therapy in diabetic retinopathy.

[Key words] Diabetes mellitus; Diabetic retinopathy; Blood; Vascular endothelial growth factor; Inflammatory cytokines

引言

DR是糖尿病常见的微血管并发症之一^[1]。DR是由代谢紊乱驱动的血管功能障碍、缺血及炎症反应等多因素共同参与的复杂过程,炎症与免疫反应贯穿其发生发展^[1,2]。VEGF及炎症因子在DR发生发展中发挥关键作用。VEGF在DR早期即明显升高,IL-6和TNF- α 参与炎症放大及血-视网膜屏障破坏,而IL-10具有重要的抗炎调节作用^[1-3]。这些细胞因子水平升高与视网膜非灌注、新生血管形成及DR严重程度密切相关,既可作为疾病活动的生物标志物,又可作为潜在治疗靶点。

抗VEGF治疗已成为DR及糖尿病黄斑水肿(DME)的核心治疗策略^[4]。既往研究证实,单侧玻璃体腔注射康柏西普不仅能改善治疗眼的视力并减轻黄斑水肿,还能显著降低对侧眼的中央黄斑厚度,这种“双侧效应”可能源于抗VEGF药物的全身吸收,使其通过血液循环系统对对侧眼产生作用^[5]。此外,动物实验亦证实静脉血及对侧眼中可检测到KH902药物浓度^[6,7]。然而,随着抗VEGF药物在临床中的广泛应用,其潜在的系统性不良反应逐渐受到关注^[1]。抗-VEGF药物在局部注射后可出现一定程度的系统吸收并可能影响全身生理功能。尽管这些风险多与全身给药相关,但局部玻璃体腔注射后的系统性炎症反应变化仍缺乏充分研究,尤其是在糖尿病早期阶段。

鉴于眼内注射的生物制剂可能通过血-眼屏障进入全身循环,对机体炎症网络产生短期调节作用,本研究基于早期糖尿病SD大鼠模型,系统评估玻璃体腔注射KH902后外周血清中VEGF及主要炎症因子的动态变化,并分析不同病程及取样时间对其影响,以期为临床DR抗VEGF治疗的系统安全性评估和给药方案优化提供实验依据。

1 方法

动物: 选用6周龄健康雄性SD大鼠66只(购自北京华阜康生

物科技有限公司,许可证编号: SCXK(京)2019-0008)。所有实验动物均饲养于SPF级屏障环境,环境参数温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $40 \pm 5\%$ 、12/12小时明暗循环。本研究所涉及的所有动物实验程序经承德医学院实验动物福利伦理委员会批准通过(伦理审批号CDMULAC-20230115-012)。

早期糖尿病大鼠模型的建立: 模型组给予高脂饲料诱导胰岛胰岛素抵抗,连续高脂饲养6周后,模型组大鼠经腹腔注射STZ(35mg/kg,溶于0.1 M pH4.5柠檬酸缓冲液)制备糖尿病模型。STZ注射72小时后,采用尾静脉采血法检测空腹血糖,符合以下标准者判定为成功建模: ①持续血糖水平 ≥ 11.1 mmol/L; ②出现典型糖尿病症状(多饮、多尿及体重减轻)。

分组设计: 糖尿病模型建立后,根据实验设计将动物按以下维度分层: (1)病程阶段: 6周/8周两个时间节点; (2)干预后取样时间点: 24小时/96小时; (3)治疗方式: KH902玻璃体腔注射/PBS注射。最终形成12个实验亚组(每组 $n=5-6$)。

玻璃体腔注射操作: 采用微量注射器(34G针头)于大鼠右眼玻璃体腔注射 $5 \mu\text{L}$ KH902溶液(含 $50 \mu\text{g}$ 康柏西普,成都康弘生物科技有限公司)或等体积PBS。所有玻璃体腔注射操作均在无菌条件下进行并术后抗感染,由眼科主任医师执行。

样品采集和处理: 在指定时间点经腹腔注射麻醉大鼠后,经腹主动脉采集全血于含EDTA抗凝剂的真空管中。所有样本获取操作均在 4°C 条件下进行,以尽量减少蛋白降解。后续将血样 4°C 下4000rpm离心20min,收集血清。所有血清样本收集后立即速冻,置 -80°C 保存备用。免疫测定前,根据需要适当稀释上述样本。

多重免疫检测技术方案: 采用Luminex xMAP多重免疫分析技术同时定量测IL-6、IL-10、TNF- α 及VEGF。使用商品化的大鼠多因子检测试剂盒按说明书操作。由于所得MFI与待测因子浓

研究问题	对比组合	比较组别	IL6	IL10	TNF- α	VEGF
药物注射后血清各指标短期变化	正药组和正PBS组对比	6正药24VS6正PBS24	-	-	-	-
		6正药96VS6正PBS96	-	-	-	-
		8正药96VS 8正PBS96	-	-	-	-
	模药组和模PBS组对比	6模药24VS6模PBS24	-	P < 0.05 \uparrow	-	-
		6模药96VS6模PBS96	-	-	-	-
		8模药96VS 8模PBS96	-	-	-	-
药物在注射后不同时间变化	正药24h与正药96h组对比	6正药24VS6正药96	P < 0.05 \uparrow	-	-	-
	模药24h与模药96h组对比	6模药24VS6模药96	P < 0.05 \uparrow	P < 0.05 \uparrow	-	-
药物注射后不同糖尿病状态变化	模药组和正药组对比	6模药24VS6正药24	-	-	-	-
		6模药96VS6正药96	-	-	-	-
		8模药96VS8正药96	-	-	-	-
药物注射后不同病程变化	6模药96和8模药96组对比	6模药96VS8模药96	-	-	-	-

表1 血清中各组别间相应指标的差异性比较结果。(注：“P < 0.05 \uparrow ”表示比较组间差异中数值升高，“P < 0.05 \downarrow ”表示比较组间差异中数值降低，“-”表示无统计学意义。)

度通常呈正相关,当某些样本浓度低于检测下限时,直接采用其MFI值进行统计分析,可获得与基于浓度分析一致的结论^[8]。因此本研究以MFI作为相对定量指标。

统计分析:使用SPSS27.0软件进行数据分析。首先对所有连续数据进行正态性检验。对符合正态分布的资料,采用独立样本t检验比较组间差异;对于不满足正态假定的数据,采用非参数检验中的Mann-Whitney U秩和检验。双侧检验P < 0.05判为差异有统计学意义。

2 结果

KH902玻璃体腔注射对血清内微环境的动态影响:药物注射后血清各指标短期变化:IL-10作为抗炎性细胞因子,糖尿病组中,给药24 h时,给药组血清IL-10水平高于PBS组(P < 0.05)。IL-6、TNF- α 和VEGF差异无统计学意义(P > 0.05)(如表1)。药物在注射后不同时间变化:正常组表现为IL-6在24h时高于96h,有统计学差异(P < 0.05);糖尿病组表现为IL-6和IL-10水平在24h时高于96h,有统计学差异(P < 0.05),TNF- α 和VEGF差异无统计学意义(P > 0.05)(如表1)。

不同病程KH902玻璃体腔注射后血清微环境影响差异:药物注射后不同糖尿病状态变化:为明确糖尿病病理状态对KH902作用的影响,我们比较了相同时间点正常大鼠与糖尿病大鼠KH902注射眼内各因子的差异。在KH902注射组间,无论取样时间为24h还是96h,糖尿病组与正常组各指标均无统计学差异(P > 0.05)。药物注射后不同病程变化:在KH902注射组间,6周与8周模型各指标均无统计学差异(P > 0.05)(如表1)。

3 讨论

本研究结果显示,早期糖尿病SD大鼠单次玻璃体腔注射KH902后,模型组大鼠血清IL-10水平于24h较PBS组有所升高,而IL-6在正常组和模型组均呈现24h高于96h的趋势,VEGF和TNF-

α 水平未见显著变化,提示该药物除局部抗血管生成外,在本研究条件下可能伴随短期、轻度的全身炎症调节效应。这一结果与既往报道部分一致。Xia等人在增殖期DR模型中报道,KH902除显著抑制VEGF表达外,还能降低IL-6水平^[9]。Wei等人在DME患者中证实,KH902可在1个月后,显著降低房水VEGF浓度,但对IL-6等炎症因子的影响有限^[10]。这表明药物的抗炎效应可能依赖病变阶段与组织屏障通透性。

另一方面,本研究未观察到KH902注射引起的系统性VEGF显著波动,与Du等在糖尿病小鼠模型中的观察一致:KH902注射后短期内眼内总VEGF水平升高,但主要源自药物-VEGF复合物,可能并不是系统性暴露增加^[7]。因此,可以推测KH902的玻璃体注射在短期内系统暴露有限,其作用局限于局部眼组织为主。

值得注意的是,本研究发现糖尿病病程不同对KH902全身效应无显著影响,提示药物在糖尿病早期阶段具有较稳定的短期系统反应特征。

综上,KH902玻璃体腔注射在早期糖尿病动物模型中表现出温和的全身炎症调节效应,未显著影响血清VEGF或TNF- α 水平,提示其安全性良好。该结果为临床DR患者局部抗VEGF治疗的全身效应提供了实验依据,并为个体化给药频率的优化提供参考。

本研究仍存在一些局限性。由于是动物模型研究非临床实验,采用MFI值而非绝对浓度进行定量分析,仅观测短期内变化趋势,样本量有限。所以建议后续研究结合更多临床客观指标,以完善抗VEGF治疗安全性和疗效评估体系。

4 结论

本研究基于早期糖尿病大鼠模型,阐明了KH902玻璃体腔注射后对血清微环境的影响,并评估了KH902玻璃体腔注射在不同病程对全身影响差异。结果证实,玻璃体腔注射KH902可在短期

内调节糖尿病SD大鼠模型的血清IL-10和IL-6水平,而未引起VEGF、TNF- α 水平显著变化,提示其局部用药可能伴随轻度的全身炎症调节效应,且具有良好的短期安全性。此外,KH902对全身效应在本研究所涉及的不同病程阶段间未见显著差异,为DR临床治疗的给药方案提供实验依据。后续研究应继续关注重复给药及长期系统性免疫反应,以进一步指导DR临床用药策略。

本研究获得2024年度承德市应用技术与开发暨可持续发展议程创新示范区专项(202404B077)和中国健康促进基金会“朗视界沐光明”科研发展项目(IIT-2025054)的资助。

[参考文献]

- [1]Gettinger K, Lee D, Tomita Y, et al. Diabetic retinopathy, a comprehensive overview on pathophysiology and relevant experimental Models:20[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(20):9882.
- [2]Yue T, Shi Y, Luo S, et al. The role of inflammation in immune system of diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic Implications[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13:1055087.
- [3]Seo H, Park S-J, Song M. Diabetic retinopathy(DR): Mechanisms, current therapies, and emerging Strategies[J]. Cells, 2025, 14(5):376.
- [4]Cheema A A, Cheema H R. Diabetic macular edema management: A review of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) Therapies[J]. Cureus, 2024, 16(1):e52676.
- [5]Di Y, Li Z, Ye J, et al. The Fellow Eye Effect of Unilateral Intravitreal Conbercept Injections in Eyes with Diabetic

Macular Edema[J]. Acta Diabetologica, 2020, 57(8):1001-1007.

[6]Di Y, Xu H, Ye J, et al. A Study on the Drug Concentration in Fellow Eyes After Unilateral Intravitreal Injection of Conbercept Into New Zealand Rabbit Eyes[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12:783057.

[7]Du L, Peng H, Wu Q, et al. Observation of total VEGF level in hyperglycemic mouse eyes after intravitreal injection of the novel Anti-VEGF drug Conbercept[J]. Molecular Vision, 2015.

[8]Breen E J, Tan W, Khan A. The Statistical Value of Raw Fluorescence Signal in Luminescence xMAP Based Multiplex Immunoassays[J]. Scientific Reports, 2016, 6:26996.

[9]Xia J-P, Liu S-Q, Wang S. Intravitreal Conbercept Improves Outcome of Proliferative Diabetic Retinopathy through Inhibiting Inflammation and Oxidative Stress[J]. Life Sciences, 2021, 265:118795.

[10]Wei Q, Wan Z, Hu Y, et al. Cytokine and Chemokine Profile Changes in Patients After Intravitreal Conbercept Injection for Diabetic Macular Edema[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2019, 13:4367-4374.

作者简介:

符蓉(2000--),女,汉族,湖南益阳人,研究生,住院医师,研究方向:眼视光、白内障和眼底病。

*通讯作者:

裴存文(1980--),男,汉族,黑龙江鸡西人,研究生,主任医师,研究方向:眼视光、白内障和眼底病。