

## · 曲安奈德临床应用研究 ·

## 曲安奈德对正常人视网膜色素上皮细胞毒性的体外研究

邹明 张军军

**【摘要】** 目的 研究曲安奈德(TA)对视网膜色素上皮(RPE)细胞的毒性作用。方法 四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法测定不同浓度(0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/ml)TA对RPE细胞增生的影响;流式细胞术检测TA[当生长抑制率达到50%时的药物浓度(IC<sub>50</sub>)]作用72h后细胞周期的变化;倒置相差显微镜和透射电子显微镜观察细胞形态和超微结构的改变。结果 0.4~0.025 mg/ml浓度范围内,与对照组比较,TA作用后RPE细胞生长均有明显抑制( $P < 0.05$ ),且呈浓度依赖性。TA组S期细胞较对照组减少10.6%( $P < 0.05$ )。光学显微镜下TA组细胞密度稀疏,形态不规则,有较多突起及细胞空泡。电子显微镜下TA组细胞核染色质分布不均,细胞质空化,甚至可见细胞坏死。结论 TA可抑制培养人RPE细胞有丝分裂S期,抑制细胞增生;明显破坏细胞结构甚至导致细胞死亡。

**【关键词】** 色素上皮,眼; 曲安奈德/药理学; 增生; 形态

中图分类号:R965 R977.1 R9361.3

**Cytotoxicity of triamcinolone acetonide on human retinal pigment epithelial cells in vitro** ZOU Ming, ZHANG Jun-jun. Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: ZHANG Jun-jun, Email: zhangjunjun@medmail.com.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the cytotoxicity of triamcinolone acetonide (TA) on cultured human retinal pigment epithelial (RPE) cells. **Methods** Effect of TA with different concentration (0.4, 0.2, 0.1, 0.05, and 0.025 mg/ml) on the proliferation of RPE cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay; The changes of cellular cycle treated by TA with the drug concentration of IC<sub>50</sub> for 72 hours were measured by flow cytometry (FCM) analysis, and the morphological and ultrastructural changes of the cells were observed by phase-contrast microscopy and transmission electron microscopy. **Results** With the concentration of 0.4-0.025 mg/ml, TA inhibited the growth of RPE cells obviously in a dose-dependent manner compared with the control ( $P < 0.05$ ), and the cells in S phase treated with TA decreased 10.6% compared with the control ( $P < 0.05$ ). Under the light microscope, sparse cells with irregular configuration and many prominences and cellular vacuoles in TA group can be seen. The results of transmission electron microscopy showed asymmetrically distributed cellular chromatin was, cavitated cytoplasm, and even some necrotic cells. **Conclusion** TA can inhibit the S-phase karyomitosis of RPE and inhibit the cellular proliferation; and destroy the cellular structure and lead to the necrosis, which indicates the cytotoxicity of TA on RPE.

**【Key words】** Pigment epithelium of eye; Triamcinolone acetonide/pharmacology; Proliferation; Morphology

曲安奈德(TA)是一种非水溶性、人工合成的长效糖皮质激素,具有很强的抗炎作用。近年来多采用玻璃体腔内注射而广泛地应用于眼内增生、水肿及新生血管性疾病的临床治疗<sup>[1-3]</sup>,以及在增生性玻璃体视网膜病变(PVR)和增生性糖尿病视网膜病变等玻璃体手术中的辅助应用<sup>[4,5]</sup>。现在尚未发现有明显的视网膜毒性作用,但在裂孔性视网膜脱离手术中,极少量的TA可能会进入神经上皮,直接与视网膜色素上皮(RPE)

接触,TA对RPE的毒性作用不清,令人担忧。为此,我们观察了TA对RPE细胞增生的影响以及形态的改变,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 人RPE细胞培养

眼球来源、RPE细胞分离、原代培养方法和细胞鉴定同文献<sup>[6]</sup>,主要试剂有Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)(美国Sigma公司产品),热灭活的小牛血清(北京哈里生

物公司产品)。原代细胞接近铺满时进行 1:2~1:3 常规传代,用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。角蛋白角免疫细胞化学染色<sup>[7]</sup>法鉴定 RPE 细胞选用 3~5 代 RPE 细胞。

### 1.2 四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法测定 TA 对 RPE 细胞增生的影响

将 RPE 细胞以  $1.25 \times 10^4$  个/ml 的密度接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ l。培养 24 h 后,更换新的培养液,加入 TA(意大利 Bristol-Myers Squibb 公司),使终浓度分别为 0(对照组)、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 mg/ml,每一浓度设 3 个复孔。常规培养 1、3、5、7 d 后,于测试前 4 h,每孔加入 MTT(5 mg/ml, 美国 Sigma 公司)20  $\mu$ l,继续孵育 4 h,终止培养,吸弃上清液,加入二甲基亚砷(DMSO)150  $\mu$ l,震荡 5~10 min 使紫色结晶完全溶解,酶标仪测定 570 nm 处的吸光度(A)[旧称光密度(OD)]值。实验重复 2 次。计算细胞生长抑制率,推算生长抑制率达到 50% 时的药物浓度(IC<sub>50</sub>),公式如下:

$$\text{细胞抑制率} = \frac{\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{实验组 } A \text{ 值}}{\text{对照组 } A \text{ 值}}$$

### 1.3 流式细胞术检测 TA 对 RPE 细胞周期的影响

将 RPE 细胞按  $5 \times 10^4$  个/ml 密度接种于 25 cm<sup>2</sup> 瓶中,静息 24 h 后,更换培养液,加入 TA 使终浓度为 IC<sub>50</sub>,继续培养 72 h 后充分洗涤、消化收集单细胞悬液,70% 乙醇固定,碘化丙啶(PI)染色,Elite Esp 型流式细胞仪(美国 Coulter 公司)测定细胞周期。同时设立正常对照组,各组设 3 个复孔。

### 1.4 TA 作用后 RPE 细胞形态的改变

加入浓度为 IC<sub>50</sub> 的 TA 作用 72 h,磷酸盐缓冲液(PBS)充分洗涤后即在倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)下观察细胞形态;消化收集单细胞悬液,3% 戊二醛固定,常规乙醇梯度脱水、浸透、包埋,超薄切片和醋酸铀、枸橼酸铅双重染色,H:600 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)下形态观察、照相。同样设立正常对照组。

### 1.5 数据处理及统计分析方法

应用 SPSS 软件进行统计学处理,各组数据采用单因素方差分析(one-way anova),推算 IC<sub>50</sub> 采用回归分析中的 Probit 进行直线拟合。 $P < 0.05$  作为差异有统计学意义的标准。

## 2 结果

### 2.1 RPE 细胞培养结果

原代培养 RPE 细胞于接种后 4~5 d 贴壁,呈多

角形或卵圆形,含丰富的色素颗粒,迅速分裂增生,10 d 左右融合。细胞传代后渐呈长梭形,色素颗粒减少。角蛋白免疫细胞化学染色<sup>[7]</sup>见细胞浆内特异性棕黄色阳性反应。证实培养细胞为人 RPE 细胞。

### 2.2 MTT 法检测细胞增生结果

**2.2.1 TA 抑制 RPE 细胞增生** 作用 1、3、5 d 后各药物组 A 值较对照组均明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),作用 7 d 后除 0.025 mg/ml 药物组和对照组 A 值的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )外,其余各药物组 A 值较之相应的对照组均不同程度降低( $P < 0.05$ )。随浓度的增加,A 值降低更为明显(表 1)。

表 1 不同浓度 TA 作用后不同时间 A 值的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	A 值 $\times 100$			
	1 d	3 d	5 d	7 d
0.4 mg/ml TA 组	6.73 $\pm$ 0.21	21.80 $\pm$ 1.30	41.87 $\pm$ 1.00	45.23 $\pm$ 1.05
0.2 mg/ml TA 组	11.40 $\pm$ 1.04	29.43 $\pm$ 2.05	52.40 $\pm$ 0.60	58.90 $\pm$ 3.26
0.1 mg/ml TA 组	12.50 $\pm$ 0.52	31.90 $\pm$ 1.42	56.87 $\pm$ 0.15	64.73 $\pm$ 0.47
0.05 mg/ml TA 组	14.63 $\pm$ 0.74	36.93 $\pm$ 2.41	65.60 $\pm$ 1.18	70.20 $\pm$ 3.34
0.025 mg/ml TA 组	14.87 $\pm$ 0.68	43.07 $\pm$ 1.46	81.80 $\pm$ 1.99	88.37 $\pm$ 0.55*
对照组	18.00 $\pm$ 1.04	49.50 $\pm$ 2.22	85.67 $\pm$ 1.51	92.43 $\pm$ 2.89

注:\* 0.025 mg/ml 药物组作用 7 d 后与对照组 A 值相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )

**2.2.2 IC<sub>50</sub> 测定结果** 根据 MTT 法测定结果,由于 TA 作用 24 h 后 A 值下降的组间差异不明显(0.2 与 0.1 mg/ml 组,0.05 与 0.025 mg/ml 组之间 A 值差异无统计学意义, $P > 0.05$ ),故选择 72 h 为后续实验的时间点。计算各浓度的细胞生长抑制率,得出 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/ml 药物组细胞生长抑制率分别为 55.96%、40.55%、35.56%、25.39% 和 12.99%。Probit 直线拟合后得出 IC<sub>50</sub> = 0.288 mg/ml ( $\approx 0.3$  mg/ml),行拟合优度  $\chi^2$  检验,拟合良好(图 1)。

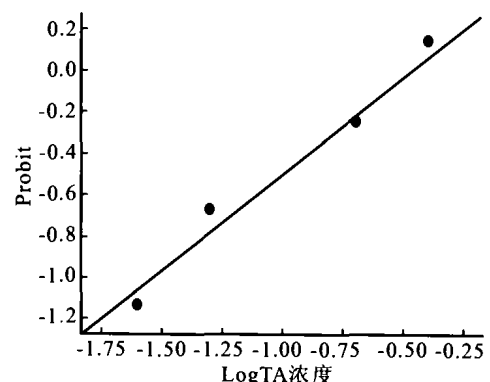


图 1 不同浓度 TA 作用 72 h 后 RPE 细胞生长抑制率的线性回归

Fig. 1 Graph of linear regression of inhibition ratio of RPE cells treated by TA with different concentrations for 72 hours

### 2.3 TA 对 RPE 细胞周期的影响

对照组 RPE 细胞处于 G<sub>1</sub> 期者占 66.4%, S 期 25.3%, G<sub>2</sub>/M 期 8.3%; 实验组 G<sub>1</sub> 期占 78.1%, S 期 14.7%, G<sub>2</sub>/M 期 7.2%。G<sub>1</sub> 期细胞增加 11.7% ( $P < 0.05$ ), S 期细胞减少 10.6% ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 细胞形态观察

**2.4.1 光学显微镜观察结果** TA 组细胞较对照组稀疏, 细胞形态极不规则、肿胀, 有很多怪异的细胞突起生成, 细胞浆内见大量细胞空泡(图 2)。

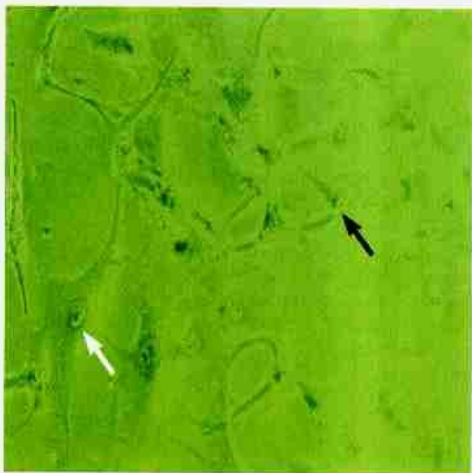


图 2 TA 作用 72 h 后 RPE 细胞倒置相差显微镜像。细胞形态不规则, 怪异的突起, 细胞浆内见细胞空泡(黑箭), 肿胀细胞(白箭) ×100

Fig. 2 Photograph of phase-contrast microscope of RPE cells treated TA for 72 hours. Irregular configuration, strange prominences, cellular vacuoles (black arrow), and swelling cells (white arrow) ×100

**2.4.2 电子显微镜观察结果** 正常 RPE 细胞细胞核呈不规则型, 核内染色质分布均匀, 细胞质内见黑色素颗粒, 线粒体、内质网、核糖体等细胞器清晰可辨, 细胞

膜不规则, 见少量细胞微绒毛(图 3A)。TA 组 RPE 细胞: 可见异常细胞形态, 其中分为两型, I 型: 较多, 早期, RPE 细胞核仁明显, 染色质分布较均匀, 细胞质内大量细胞空泡, 尚可辨认线粒体等其它细胞器, 可见环形板层排列的髓鞘样变性, 细胞膜基本完整(图 3B); 后期, 细胞质空化更为明显, 除黑色素颗粒可清晰辨认外, 其他的细胞器明显减少, 细胞膜局部破坏(图 3C)。II 型: 较少, 细胞呈坏死状态, 细胞核染色质分布不均, 细胞质内各细胞器消失, 细胞膜破碎(图 3D)。

### 3 讨论

在研究 PVR 的治疗时就有报道地塞米松、TA 等糖皮质激素具有抑制 RPE 细胞增生的作用。Yeung 等<sup>[8]</sup>比较 TA、地塞米松和氯化可的松对 RPE 细胞的毒性作用, 发现 TA 抑制细胞生长的作用最强。此类药物抑制细胞增生的机制还不是很清楚, 尤其是 TA 的相关报道较少。对地塞米松的研究中发现其可能通过抑制细胞 DNA、RNA 或蛋白质的合成<sup>[9]</sup>, 直接抑制 RPE 细胞有丝分裂 S 期或者 G<sub>2</sub>/M 期<sup>[10]</sup>而达到抑制细胞增生的目的。

我们采用 MTT 法和流式细胞术检测 TA 对 RPE 细胞增生的影响。MTT 法于 1983 年由 Mosmann<sup>[11]</sup>首先描述, 它可间接反映活细胞数量, 检测细胞活力; 流式细胞术可检测细胞内 DNA 的含量, 得出各时期细胞占整个细胞群体总数的百分比, S 期为 DNA 合成期, 其比例越高, 说明细胞增生越明显。我们通过 MTT 法发现 0.4~0.025 mg/ml TA 均能抑制细胞增生, 且有剂量效应关系。流式细胞术检测也发现 TA

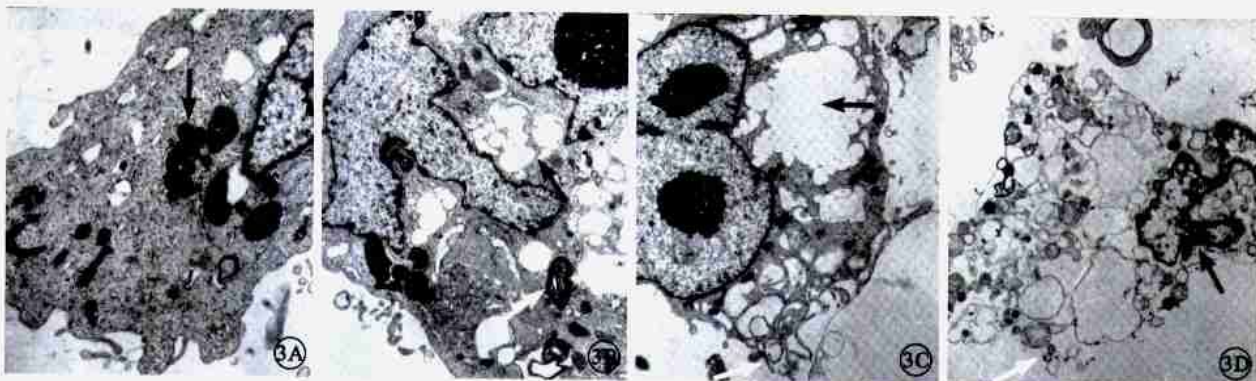


图 3 对照组和 TA 作用 72 h 后 RPE 细胞电子显微镜像。3A. 对照组细胞染色质分布均匀, 细胞器清晰可辨, 散见黑色素颗粒(黑箭) 醋酸铀、枸橼酸铅染色 ×10 000 3B. TA 组细胞早期细胞质空化(黑箭), 髓鞘样变性(白箭), 散见黑色素颗粒 醋酸铀、枸橼酸铅染色 ×6 000 3C. TA 组细胞后期细胞质空化明显(黑箭), 细胞膜局部破坏(白箭) 醋酸铀、枸橼酸铅染色 ×6 000 3D. TA 组细胞坏死, 染色质分布不均(黑箭), 细胞器消失, 细胞膜破碎(白箭) 醋酸铀、枸橼酸铅染色 ×6 000

Fig. 3 Photograph of electron microscope of RPE in control and TA treated group for 72 hours. 3A. in the control group, symmetrically distributed cytochromatin, clear cellular organelles and melanin granules (black arrow) Uranyl acetate and lead citrate staining ×10 000 3B. TA-treated cells with vacuoles (black arrow), degeneration organelles (white arrow) and some melanin granules in earlier stage Uranyl acetate and lead citrate staining ×6 000 3C. TA-treated cells with obvious vacuoles (white arrow) and partly destroyed cellular membrane (white arrow) Uranyl acetate and lead citrate staining ×6 000 3D. cell necrosis with asymmetrically distributed chromatin (black arrow), disappeared organelles, and ruptured membrane (white arrow) Uranyl acetate and lead citrate staining ×6 000



组 S 期细胞明显减少(10.6%),证实 TA 具有抑制 RPE 细胞增生的作用,其机制可能在于抑制 DNA 的合成而抑制细胞的有丝分裂。

细胞形态的正常是维持细胞功能的关键,一旦细胞结构发生改变应高度警惕细胞功能的减弱或丧失,因此观察细胞形态可以间接了解细胞的功能状态。我们首次利用细胞形态学来验证 TA 对 RPE 细胞的毒性作用,结果发现 TA 组 RPE 细胞的超微结构受到不同程度的破坏,甚至出现细胞死亡的形态,此形态改变与传统细胞坏死相符,表现为细胞浆和细胞核的进行性溶解,最终细胞膜破裂,细胞内容物释放到周围环境中。坏死细胞中细胞核溶解,细胞浆发生水肿性变性,可能是由于正常存在于细胞浆中的分解代谢酶的激活所致<sup>[12]</sup>。细胞一旦坏死,其分泌蛋白和产生三磷酸腺苷等代谢功能就随之完全丧失,是一种严重的病理改变。而对于另一种死亡方式——细胞凋亡,在本研究中则未发现。以往实验证实糖皮质激素可引起 C-myc、C-myb 等细胞增生相关基因表达下调,特异性核酸内切酶表达增加,使 DNA 降解,随后发生细胞凋亡<sup>[13,14]</sup>。Yeung 等<sup>[15]</sup>也发现 TA 可激活 caspase-3(半胱氨酸蛋白酶-3)途径诱导 RPE 细胞凋亡,并且药物浓度达到一定阈值,可以导致细胞坏死。我们在实验中未发现凋亡,原因可能在于作用时间较长(72 h),无论是细胞受到轻微破坏,还是凋亡或坏死,因在培养液中不能被及时清除,最终都可由于自身功能减弱,生长活力下降而发生自溶,表现成细胞坏死。

尽管我们证实了 TA 能对 RPE 细胞产生细胞毒性,但它是基于体外实验得出的,与体内环境有一定的差异。因此还有待进一步的研究来明确其毒性作用机制,以及更多的体内实验来确定临床应用中药物浓度和作用时间的安全范围。

#### 4 参考文献

- 1 Danis RP, Cinlla TA, Pratt LA, et al. Intravitreal triamcinolone acetate in exudative age-related macular degeneration. *Retina*, 2000, 20: 244-250.
- 2 Ip MS, Kumar KS. Intravitreal triamcinolone acetate as treatment for macular edema from central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol*, 2002, 120:1217-1219.
- 3 Jonas JB, Hayler JK, Sofker A, et al. Intravitreal injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*, 2001, 131:468-471.
- 4 Sakamoto T, Miyazaki M, Hisatomi T, et al. Triamcinolone-assisted pars plana vitrectomy improves the surgical procedures and decreases the postoperative blood-ocular barrier breakdown. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2002, 240: 423-429.
- 5 Peyman GA, Cheema R, Conway MD, et al. Triamcinolone acetate as an aid to visualization of the vitreous and the posterior hyaloid during pars plana vitrectomy. *Retina*, 2000, 20: 554-555.
- 6 王雨生, 严密. 可见光对原代培养人视网膜色素上皮细胞的光化学损伤. *中华眼底病杂志*, 1996, 12: 174-176.
- 7 Mclellan GJ, Bedford PG. The cytoskeletal intermediated filaments of canine retinal pigment epithelial cells in vivo and in vitro. *Res Vet Sci*, 1997, 63:245-251.
- 8 Yeung CK, Chan KP, Chan CK, et al. Cytotoxicity of triamcinolone on cultured human retinal pigment epithelial cells: comparison with dexamethasone and hydrocortisone. *Jpn J Ophthalmol*, 2004, 48: 236-42.
- 9 Chandler DB, Hida T, Sheta S, et al. Improvement in efficacy of corticosteroid therapy in an animal model of proliferative vitreoretinopathy by pretreatment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1987, 225: 259-265.
- 10 Liu B, Hui Y, Wang Y, et al. Dexamethasone modulation on cultured human retinal pigment epithelial cell. *Yan Ke Xue Bao*, 2001, 17:27-30.
- 11 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J Immuno Methods*, 1983, 65: 55-63.
- 12 Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol(Berl)*, 1990, 181: 195-213.
- 13 Medh RD, Wang A, Zhou F, et al. Constitutive expression of ectopic c-Myc delays glucocorticoid-evoked apoptosis of human leukemic CEM-C7 cells. *Oncogene*, 2001, 20:4629-4639.
- 14 Geng CD, Vedeckis WV. Steroid-responsive sequences in the human glucocorticoid receptor gene 1A promoter. *Mol Endocrinol*, 2004, 18:912-924.
- 15 Yeung CK, Chan KP, Chiang SWY, et al. The toxic and stress of cultered human retinal pigmental epithelium (ARPE19) and human glial cells (SVG) in the presence of triamcinolone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 5293-5300.

(收稿日期:2005-05-11)

(本文编辑:朱敏)

## · 消息 ·

### 福州东南眼科医院诚聘眼科各专业医师

福州东南眼科医院是福州市唯一的眼病专科医院,医院面积 6 000 平方米。具备多功能、网络化和全开放格局的现代化眼科医疗机构。医院现有员工 170 余名,分 9 个专业组:白内障组、屈光眼肌组(近视、远视、散光、斜视、弱视)、青光眼组、角膜病组、眼底病组、眼外伤组、玻璃体视网膜组、美容整形组、眼预防保健组。我院拥有先进的眼科诊断和治疗设备,全进口设备包括:白内障超声乳化仪、准分子激光系统、眼前 YAG 激光、OCULIGHT SLX810 激光、佳能免散瞳眼底照相机、OCT、RTA、UBM、HRT-1、多台综合检查仪、蔡司、莱卡手术显微镜等等。医院为得到进一步的发展,诚聘以下专业医师。

优先招聘专业:①青光眼组;②角膜病组。

医生应聘条件:从事专业 5 年以上,能够独立诊治本专业疾病,掌握本专业发展动态,有丰富临床经验者。

医院提供条件:①医院提供住房;②副主任医师以上者,可随迁家属子女户口(临床经验丰富的高年资主治医师也可);③年薪保底 10 万元人民币。

有意者请速将个人简历、相关证件复印件及近期照片邮寄至:福州东南眼科医院,联系人:于海波。地址:福州市西二环南路 35 号(邮政编码:350002) 电话:0591-83891766。医院其它专业组正在诚聘医师,有意者请将相关资料邮寄至上述地址(长期有效)。