

青光安颗粒含药血清对加压后人小梁细胞活性的影响

彭清华¹, 曾志成², 李波¹, 卓业鸿³

基金项目: 中国湖南省教育厅科研基金重点资助项目(No. 06A052); 中国湖南省卫生厅科研基金资助项目(No. 204084)

作者单位:¹(410007)中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学第一附属医院眼科;²(410007)中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学;³(510060)中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心

作者简介: 彭清华, 医学博士, 教授, 主任医师, 全国眼底病中医医疗中心主任, 中国中西医结合学会眼科专业委员会副主任委员, 世界中医药学会联合会眼科分会常务理事, 中华中医药学会眼科分会常务委员, 研究方向: 青光眼、眼底病和眼表疾病。

通讯作者: 彭清华. pqhz_520@163. com

收稿日期: 2009-02-26 修回日期: 2009-03-30

Effect of serum containing qingguang'an grains on pressurized human trabecular cells activity

Qing-Hua Peng¹, Zhi-Cheng Zeng², Bo Li¹, Ye-Hong Zhuo³

Foundation items: Science Research Foundation Key Project of Education Office of Hunan Province, China (No. 06A052); Science Research Foundation Project of Health Office of Hunan Province, China (No. 204084)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China; ²Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China; ³Eye Center, Sun Yet-Sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Qing-Hua Peng, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. pqhz_520@163. com

Received: 2009-02-26 Accepted: 2009-03-30

Abstract

• **AIM:** To observe the effects of serum containing qingguang'an grains on the activity of pressurized human trabecular cells cultured *in vitro*, and to investigate the mechanism of action in preventing and reducing the as census of postop intraocular pressure on primary open angle glaucoma.

• **METHODS:** The qingguang'an grains-contained serum was prepared, and the pressurized human trabecular cells were incubated with serum containing 2.5 times, 5 times, 10 times and 20 times qingguang'an grains and 5 times yimaikang tablets, respectively, for 12 hours, 24 hours, and 36 hours. The cell morphology was observed and cell activity (OD) was detected by MTT.

• **RESULTS:** OD value of pressurized human trabecular cells is concerned with concentration and action time of

qingguang'an grains. On OD value, 5 times, 10 times and 20 times qingguang'an Grains groups were higher than blank group ($P < 0.01$), 10 times and 20 times qingguang'an grains groups were higher than yimaikang Tablets group ($P < 0.01$), but no conspicuous different between 5 times qingguang'an grains groups and 5 times yimaikang Tablets group; OD value of the cells cultured in qingguang'an grains-contained serum for 24 hours and 36 hours were higher than that cultured for 12 hours ($P < 0.01$), but no conspicuous different between 24 hours and 36 hours.

• **CONCLUSION:** Serum containing qingguang'an grains can raise pressurized human trabecular cells activity.

• **KEYWORDS:** qingguang'an grains; serum containing drug; human trabecular cells; activity; MTT assay

Peng QH, Zeng ZC, Li B, *et al.* Effect of serum containing qingguang'an grains on pressurized human trabecular cells activity.

Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi) 2009;9(5):839-842

摘要

目的: 观察青光安颗粒对体外加压培养人小梁细胞活性的影响, 探讨青光安颗粒预防与治疗原发性开角型青光眼术后眼压回升的作用机制。

方法: 制备 2.5 倍、5 倍、10 倍、20 倍青光安颗粒含药血清和 5 倍益脉康含药血清, 用不同药物与浓度的含药血清分别作用体外加压培养人小梁细胞 12、24、36h, 观察细胞形态学的变化和 MTT 法检测的细胞活性 (OD) 的变化。

结果: 加压后小梁细胞的 OD 值与青光安颗粒的浓度和作用时间均有关系。青光安 5 倍、10 倍、20 倍组都能够明显提高细胞 OD 值, 与空白组比较有显著性差异 ($P < 0.01$), 10 倍、20 倍组与益脉康组比较有显著性差异 ($P < 0.01$), 但是青光安 10 倍组与 20 倍组之间没有统计学意义; 培养 24、36h 的 OD 值明显高于培养 12h 的 OD 值 ($P < 0.01$), 但是培养 24h 与培养 36h 时间段之间没有统计学意义。

结论: 青光安颗粒能够提高加压后人眼小梁细胞的活性。
关键词: 青光安颗粒; 含药血清; 人小梁细胞; 活性; MTT 法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2009.05.010

彭清华, 曾志成, 李波, 等. 青光安颗粒含药血清对加压后人小梁细胞活性的影响. 国际眼科杂志 2009;9(5):839-842

0 引言

原发性开角型青光眼是青光眼主要致盲疾病之一, 迄今为止, 其病因及发病机制尚不清楚。现已证明, 原发性开角型青光眼的眼压升高是由于房水排出通道的病变, 使房水排出阻力增加所致。房水流出通道大部分衬覆有小梁细胞, 研究证明小梁细胞具有多种功能, 诸如吞噬、收缩、合成及分解糖蛋白, 产生前列腺素等生物活性物

质,这些功能使得小梁细胞在房水排出的生理和病理过程中具有重要影响^[1]。以往研究表明小梁细胞数量减少是原发性开角型青光眼小梁组织的重要改变^[2]。益脉康片是以灯盏细辛为主要药材的单方制剂,药理研究表明能够对视网膜视神经节细胞、小梁细胞、血管内皮细胞、肝细胞等具有保护作用,抑制细胞凋亡^[3],同时能够明显改善眼压已控制的青光眼患者视盘和视盘旁视网膜微循环^[4],临床研究表明具有改善眼压已控制的青光眼患者视野等作用^[5]。青光安颗粒剂是集我院眼科多年临床经验结合现代制剂制备工艺研制而成,主要成分是黄芪、生地、茯苓、车前子、地龙、赤芍、红花、白术等,共奏益气养阴、活血利水的作用。应用于临床能够明显提高青光眼术后患者的视力,扩大视野,预防其术后眼压回升,但其预防术后眼压回升的作用机制尚不十分清楚。因此,我们在对人眼小梁细胞培养加压的基础上,用MTT法研究了不同浓度青光安颗粒剂含药血清对加压后小梁细胞活性的影响,并且与益脉康片含药血清组进行对照,以探讨青光安颗粒预防原发性开角型青光眼术后眼压回升的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

药物:青光安颗粒剂(批号020208)由湖南中医药大学第一附属医院药剂科制备,产品批号020208;益脉康片剂由湖南湘雅制药有限公司生产,产品批号国药准字Z20010081。动物:3月龄的SD大鼠30只,由湖南农业大学动物实验中心提供。雌、雄不拘,体质量160~180g。主要试剂:胎牛血清(杭州四季清公司生产);DMEM培养基(3.6g/包,美国GIBCO公司生产);磷酸盐缓冲液PBS粉(福州迈新生物公司);不含Ca²⁺、Mg²⁺的Hanks液(自配);2.5g/L胰蛋白酶粉(美国GIBCO公司生产);青链霉素双抗(Hyclone公司生产);二甲基亚砜(上海生物工程公司生产);MTT(鹏程生物公司生产)。主要仪器:超净工作台(苏州安泰空气技术公司生产);CO₂培养箱(2300型,USA生产);倒置相差显微镜(南京江南光电公司生产);数码相机(佳能公司生产);低速离心机(长沙平凡仪器仪表公司生产);低温冰箱(日本SANYO公司生产);50cm²培养瓶、96孔培养板(美国COSTER公司生产);血球计数板(上海求精生化公司生产);酶联免疫检测仪(Austria生产);细胞加压模型(自制)。细胞来源及特性:人小梁细胞(human trabecular cells,HTCs)细胞株,由中山大学中山眼科中心卓业鸿教授提供。经纤维粘连蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)相关抗原免疫细胞化学鉴定均为阳性,倒置显微镜下观察细胞介于上皮细胞型和成纤维细胞型之间,形态多样,梭形、椭圆形、纺锤形和不规则形等,被证实所培养的细胞为人小梁细胞。

1.2 方法

含药动物血清制备SD大鼠30只,随机分为6组,分别为模型组、益脉康5倍组、青光安2.5倍组、青光安5倍组、青光安10倍组和青光安20倍组。模型组灌服等量蒸馏水,益脉康5倍组按成人2.8g/kg剂量灌胃给予益脉康片,青光安颗粒2.5倍、5倍组、10倍组和20倍组4个剂量组分别按2.25、4.5、9、18g/kg剂量灌胃给予青光安颗粒,连续7d,1次/d。末次灌药后1h,颈主动脉取血,分离血清,所取血清经56℃、30min灭活处理后,用0.22μm的微孔膜过滤除菌,置-20℃冰箱保存备用。人眼小梁细胞培养传代及细胞加压模型的建立:人小梁细胞(HTCs)复苏后,加入适量含200mL/L胎牛血清的DMEM液,放入CO₂培养箱培养。待细胞贴壁后,每周换

液2~3次,细胞长满瓶底后,用2.5g/L胰蛋白酶消化传代,传至第5代开始进行体外加压。方法参照薛蔚^[6]实验方法,取接近融合的人小梁细胞,用带“T”型三通管的橡皮塞塞紧培养瓶口,一端用注射器注入无菌空气加压,同时从与三通管相通的压力表中直接读取压力值,压力保持在60mmHg,加压24h。倒置显微镜下观察细胞形态并摄像,然后取一培养瓶细胞用2.5g/L胰蛋白酶消化,移入离心管中离心,加入25g/L戊二醛-20g/L多聚甲醛混合液固定,经常规乙醇和丙酮逐级脱水,环氧树脂618包埋,LKB-V超薄切片片机切片,醋酸铀,枸橼酸铅双染后,行透射电子显微镜观察细胞超微结构。MTT法检测经不同含药血清作用不同时间后小梁细胞的增殖情况:取经过加压24h的小梁细胞,经2.5g/L蛋白酶消化后制成细胞悬液,调整细胞密度为5×10⁴个/mL,按每孔0.25mL接种于96孔培养板×3板,每个培养板分为7组,每组设6复孔,放入37℃,50mL/L CO₂孵箱培养24h待细胞贴壁后,用Hanks液洗涤3次,随机分组进行实验,A组(空白组):200g/L DMEM 250μL,B组(不含药大鼠血清组)不含药大鼠血清50mL+200g/L DMEM 200μL,C组(益脉康5倍组):50μL益脉康血清+200g/L DMEM 200μL,D,E,F,G组(青光安2.5倍组,5倍组,10倍组,20倍组);不同浓度青光安血清50μL+200g/L DMEM 200μL。3个培养板于37℃,50mL/L CO₂孵箱中分别孵育12,24,36h后,凋零孔加Hanks液,其余各孔加入20μL MTT(5mg/mL),于37℃培养4h,吸净孔中的液体,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150μL,充分震荡5min,使结晶物充分溶解,立即在酶标仪(λ=490nm)单波长测定光密度(OD)值,以上步骤在相同条件下重复3次。

统计学分析:计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用SPSS 14.0软件进行统计学处理,采用配伍组设计资料的方差分析和多重比较,检验水准为P<0.05。

2 结果

2.1 小梁细胞形态观察

倒置显微镜下观察细胞形态,可见体外培养的HTCs形态介于上皮细胞型和成纤维细胞型之间(图1),呈梭形、椭圆形、纺锤形和不规则形等,细胞突起较多,细胞融合后,突起消失。胞质丰富,常含有少许色素颗粒,胞核圆形或者椭圆形。细胞多在传代后12~24h开始贴壁生长,形态很快由圆形伸展成扁平状,细胞在48h后生长速度显著加快,72h后开始有细胞融合,一般均在1wk内完成融合,形成稳定的单层细胞层,细胞边缘紧密相连。

2.2 小梁细胞体外加压后形态变化和其超微结构变化

人眼小梁细胞经过体外60mmHg加压24h后,倒置显微镜下可见部分细胞皱缩变圆,立体感减低,胞质内有少量空泡,细胞间隙加大,甚至有少许细胞浮起(图2)。透射电镜观察部分细胞超微结构轻微改变,表面微绒毛消失,部分细胞胞内脂滴及空泡增多,线粒体轻度肿胀,严重者细胞线粒体嵴肿胀,排列紊乱,甚至空泡化,粗面内质网扩张成泡状。

2.3 不同浓度含药血清作用24h后小梁细胞生长状况

倒置显微镜下观察不同浓度含药血清作用24h后加压小梁细胞生长状况表明,空白组、不含药血清组小梁细胞数目较少,部分细胞收缩圆形,细胞间隙较大;青光安5倍组和益脉康5倍组比较小梁细胞数目和形态无明显区别;青光安10倍组和青光安20倍组小梁细胞数目均比前面4组小梁细胞数目要多,细胞排列紧密,胞体为梭形(图3)。

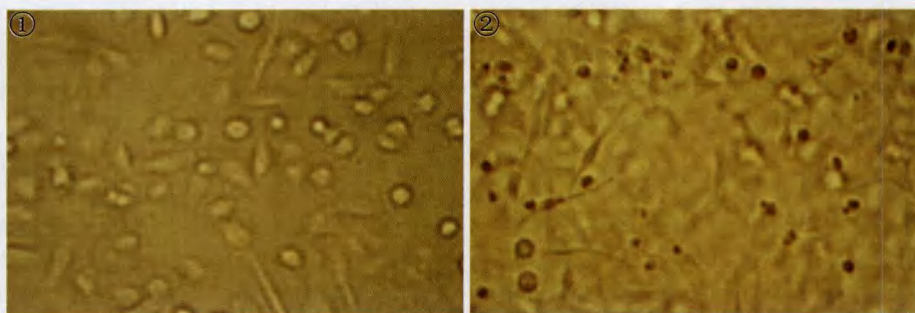


图1 传3代小梁细胞(×200)

图2 体外加压24h后小梁细胞(×200)

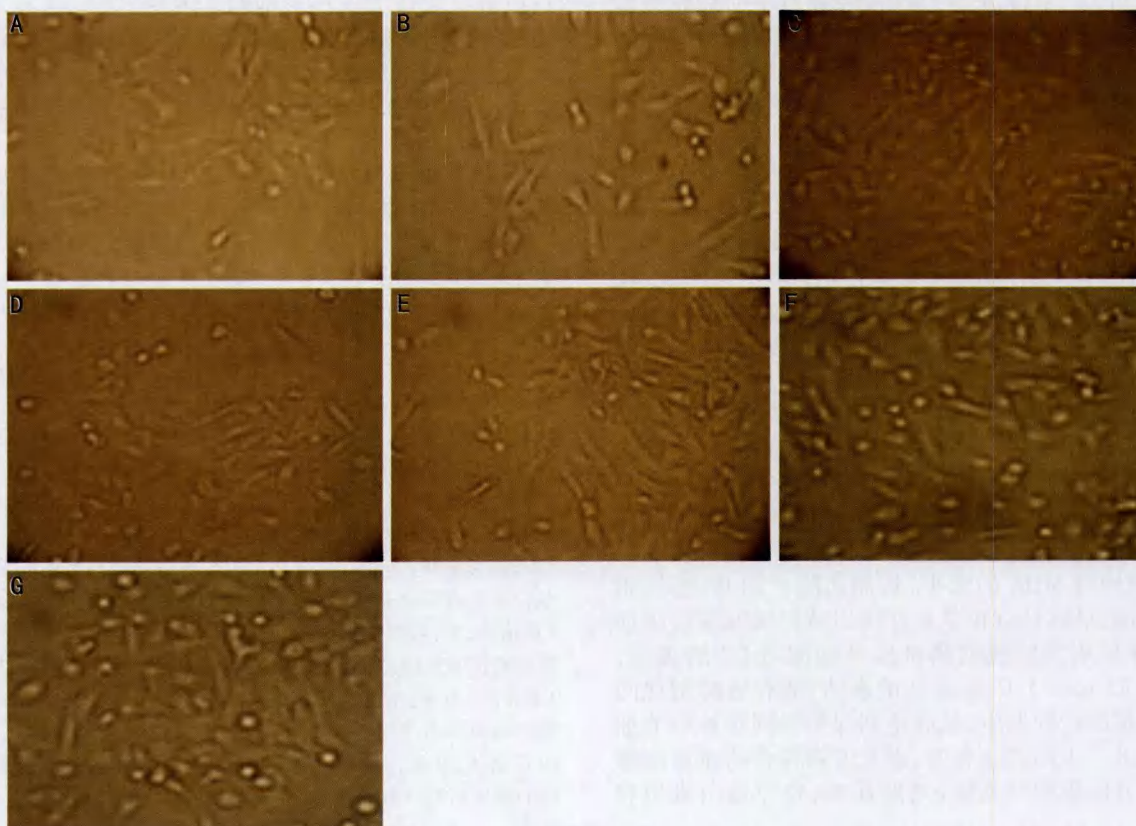


图3 各浓度含药血清组作用24h后小梁细胞生长状况(×200) A:空白组;B:不含药血清组;C:益脉康5倍组;D:青光安2.5倍组;E:青光安5倍组;F:青光安10倍组;G:青光安20倍组

表1 不同药物与浓度含药血清作用12,24,36h后各组的OD值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	12h	24h	36h	F值	P值
空白组	0.11 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.13 ± 0.05	41.642	0.000
不含药血清组	0.11 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.14 ± 0.03		
益脉康5倍组	0.16 ± 0.02	0.20 ± 0.04	0.20 ± 0.05		
青光安2.5倍组	0.11 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.03		
青光安5倍组	0.15 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.20 ± 0.03		
青光安10倍组	0.20 ± 0.03	0.26 ± 0.05	0.28 ± 0.06		
青光安20倍组	0.21 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.29 ± 0.03		
F值	20.994				
P值	0.000				

2.4 各浓度含药血清组12,24,36h细胞的OD值(表1)

通过配伍组设计资料的方差分析,不同药物与浓度含药血清的 $F=41.642, P=0.000$,故认为不同药物与浓度含药血清是OD值的影响因素;不同作用时间的 $F=20.994, P=0.000$,故认为不同作用时间也是OD值的影响因素。进一步的多重比较结果显示:(1)5倍,10倍,20倍青光安

血清组、5倍益脉康血清组与空白组两两比较,差异均有统计学意义($P=0.000$),而不含药血清组,2.5倍青光安血清组与空白组间差异均无统计学意义($P=0.660$ 和 $P=0.330$);益脉康5倍与青光安5倍组两两比较,差异无统计学意义($P=0.771$),青光安10倍组、20倍组与青光安5倍组两两比较,差异均有统计学意义($P=0.000$);青

光安10倍组与青光安20倍组两两比较,差异无统计学意义($P=0.319$)。(2)24,36h时间段与12h时间段两两比较,差异均有统计学意义($P=0.000$);36h时间段与24h时间段两两比较,差异无统计学意义($P=0.323$)。

3 讨论

MTT检测方法是检测细胞活性的一种简便、精确的方法,其原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能够将黄色的MTT降解成紫蓝色的化合物formazan沉积于细胞中,而死亡细胞则不能代谢MTT成formazan,因此formazan形成是反应细胞增殖的一个重要指标,且其含量与活细胞的数量成正相关。MTT法显色深浅随孔板中活细胞数增加而逐渐加深,其吸光值(A)亦随之升高。本实验研究表明,在一定浓度范围内(5~20倍),青光安颗粒均可使小梁细胞吸光度值提高、抑制加压后小梁细胞的凋亡。本实验研究还发现,青光安5倍组与益脉康5倍组使小梁细胞存活的能力相当,青光安10倍、20倍组促进小梁细胞存活的能力优于益脉康5倍组,但青光安10倍、20倍组之间比较无统计学意义;当作用时间达到36h后,虽然没有出现对细胞的抑制作用或者毒副作用,但与作用24h比较小梁细胞的存活能力提高不明显。由此说明:(1)加压后小梁细胞的OD值,不随青光安含药血清浓度的提高而增强,量效以10倍组最佳和最有意义;(2)加压后小梁细胞OD值,亦不随作用时间的延长而不断增强,加药1次后的时效以24h组最强。青光安颗粒剂前期实验研究^[7-9]显示能保护和改善急性高眼压大鼠视网膜的活性节细胞,并对慢性高眼压状态下兔眼视网膜的超微组织结构有明显的保护作用;能明显提高急性高眼压状态后视网膜SOD活性,降低视网膜MDA的水平,从而清除自由基,减轻脂质过氧化作用,最终达到抗氧化作用以减轻视网膜组织损伤;能促进体外培养的视网膜神经节细胞Bcl-2的表达,抑制其Bax, Caspase-3, Caspase-8的表达,能有效抑制视网膜神经节细胞凋亡的发生,从而达到保护视网膜神经节细胞的作用。进一步的实验表明,青光安颗粒含药血清能降低小梁细胞分泌细胞外基质(透明质酸,胶原蛋白III型和

层粘连蛋白),减少细胞外基质的堆积作用。青光安颗粒剂临床研究^[10]表明青光安颗粒剂能改善患者的血液流变学,改善眼部血液循环,提高血管内皮细胞活性,降低血小板活化功能,降低血浆ET-1(内皮素-1)、血栓素、前列腺素的含量,提高视网膜、视神经等内眼组织的耐缺氧、抗损伤功能,从而明显提高青光眼术后患者的视力,扩大视野,预防其术后眼压回升。口服青光安的青光眼术后患者,视力疗效的巩固率为94.87%,视野疗效的巩固率为96.15%,眼压维持在正常范围率97.44%,均高于术后常规治疗组的70.37%,75.93%,85.19%。我们发现,青光安10倍含药血清组作用加压小梁细胞24h后,能够明显增强小梁细胞的活力,抑制细胞的凋亡。推测青光安颗粒正是通过增强小梁细胞的活力,减少细胞凋亡,保护小梁细胞数量,维护房水排出通道的顺畅来预防术后眼压回升。

参考文献

- 1 王宁利,梁远波,乔利亚,等.拉坦前列腺素降低眼压作用与小梁网房水排出途径的关系探讨.中华眼科杂志2006;42(4):342-344
- 2 杨晓岗,张德秀,刘思伟,等.大麻素对牛眼小梁细胞增殖、粘附和迁移的影响.国际眼科杂志2008;8(7):1343-1345
- 3 孟凡振,鲁小燕.灯盏细辛的药理学研究进展.医药导报2003;22(9):636-637
- 4 刘东敬,鲍捷,陈晓明,等.灯盏细辛对眼压已控制青光视网膜微循环的影响.国际眼科杂志2006;6(1):107-109
- 5 项敏泓,钟一声,张兴儒.灯盏细辛对眼压已控制青光眼患者视野的保护作用.国际眼科杂志2006;6(4):806-809
- 6 薛蔚,杜蜀华,李勇,等.压力对牛眼小梁细胞增殖和凋亡的影响.中华眼科杂志2002;38(6):340-343
- 7 罗萍,彭清华,李波,等.青光安颗粒剂对慢性高眼压兔眼滤过性手术后作用的实验研究.中国中西医结合杂志2000;7(2):121-122
- 8 彭清华,罗萍,李波,等.青光安颗粒剂对实验性高眼压大鼠视网膜神经节细胞代谢作用的研究.湖南中医学院学报1997;1(2):53-55
- 9 彭清华,罗萍,李波,等.青光安颗粒剂对慢性高眼压兔眼视网膜超微结构的影响.湖南中医学院学报1998;18(4):9-10
- 10 彭清华,罗萍,李传课,等.青光安颗粒剂对抗青光眼术后患者作用的临床研究.中国中医眼科杂志1997;7(3):151-154