

来氟米特活性代谢物 A77 1726 对翼状胬肉成纤维细胞增生的影响

晏雪莹 张明昌 王 凯 郝 念 张 洁

The effect of active metabolite from leflunomide on the proliferation of human pterygium fibroblasts

Yan Xueying, Zhang Mingchang, Wang Kai, Hao Nian, Zhang Jie. Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract Objective Leflunomide has been utilized in the treatment of various autoimmunopathies in ophthalmology in clinic, and its antifibrosis also has been verified. However, its effect on human pterygium fibroblasts (HPFs) is unclear. Present study was to investigate the effect of A77 1726, an active metabolite from leflunomide, on the proliferation of HPFs in vitro in order to find a novel method for the treatment and prevention of pterygium. **Methods** Human pterygium specimen was collected during pterygium excision. Human pterygium tissue masses were cultured to harvest the HPFs and cultured HPFs were identified using Vimentin antibody, α -SMA antibody and immunochemistry. A77 1726 was added into the DMEM containing 3% fetal bovine serum to treat the 3rd - 7th passage of HPFs in the concentration among 20 - 200 $\mu\text{mol/L}$. MTT was used to assay the biologic activities under the different doses of A77 1726 at the 24th, 48th, 72nd, 96th hour. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in each group was detected by immunochemistry. **Results** Cultured HPFs showed positive stain for α -SMA and Vimentin antibody. The optical absorbance value (A value) was significantly different among different dosage of A77 1726 ($F_{\text{dosage}} = 17.916, P < 0.05$;) and different time group ($F_{\text{time}} = 22.551, P < 0.05$) and presented a considerable decrease upon dosage and action time of A77 1726 ($P < 0.05$). The inhibitory rate of A77 1726 on proliferation of HPFs was significantly higher with the increase of dosage and treating time of A77 1726. After treated with 20 - 200 $\mu\text{mol/L}$ A77 1726, the expression of PCNA in HPFs was obviously influenced by the dosage of A77 1726 ($H = 80.232, P < 0.05$). **Conclusion** A77 1726 has a potential inhibition on HPFs proliferation in a dose- and time-dependent manner in a limited circumscription.

Key words leflunomide; pterygium; human pterygium fibroblasts; proliferation

摘要 目的 观察来氟米特活性代谢物丙二酸次氯酰胺 (A77 1726) 对体外培养的人翼状胬肉成纤维细胞 (HPFs) 增生的影响, 寻找翼状胬肉药物辅助治疗和预防复发的新方法。 **方法** 采用组织块法原代培养 HPFs, 筛选 A77 1726 药物浓度, 采用 0 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 A77 1726 作用与体外培养的第 3 ~ 7 代 HPFs, 分别于 24 ~ 96 h 后观察各梯度浓度 A77 1726 对 HPFs 的影响。 MTT 法检测 HPFs 的增生活性; 免疫细胞化学法测定 HPFs 中增生细胞核抗原 (PCNA) 的表达程度。 **结果** 在 20 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度作用 24 ~ 72 h, A77 1726 可呈浓度依赖和时间依赖性地抑制 HPFs 增生 ($P < 0.05$)。 A77 1726 浓度在 20 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ 时能浓度依赖性地抑制 HPFs 中 PCNA 的表达 ($P < 0.05$)。 **结论** A77 1726 可显著抑制体外培养的 HPFs 增生活性, 且这种抑制作用在一定范围内呈浓度依赖性和时间依赖性。

关键词 来氟米特; 翼状胬肉; 成纤维细胞; 增生

分类号 R 777.33 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0174-04

翼状胬肉是一种常见的眼表疾病, 发病机制尚不

明确, 可能与长期慢性紫外线照射、角膜缘屏障功能损伤、免疫反应、遗传等多种因素有关, 以增生、细胞外基质结构破坏、纤维化及血管生成为特点。来氟米特 (leflunomide, LEF) 是一种新型抗代谢型免疫抑制剂, 口服后 95% 以上在胃肠道和肝脏内分解代谢, 形成活

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科 (晏雪莹、张明昌、郝念、张洁); 432500 湖北省云梦县人民医院眼科 (王凯)

通讯作者: 张明昌 (Email: mingchangzhang@hotmail.com)

性代谢产物丙二酸次氯酰胺(A77 17126)^[1]。目前已广泛应用于临床治疗各种自身免疫性疾病,此外也有研究证实 LEF 还存在抗纤维化活性^[2]。在眼科疾病中 LEF 曾被试用于 Graves 病、葡萄膜炎和穿透角膜移植术后抗排斥反应^[3-4]。本实验观察 LEF 活性代谢物 A77 1726 对体外培养的人翼状胬肉成纤维细胞(human pterygium fibroblasts, HPFs)增生的影响,寻找翼状胬肉药物辅助治疗和预防复发的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 选取 2007 年 8~11 月华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科住院患者手术切除的翼状胬肉。术前及术中患眼局部未使用任何药物。

1.1.2 主要试剂 0.25% 胰蛋白酶、DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(武汉三利生物工程有限公司);SABC 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒、小鼠抗人 α -SMA 蛋白单克隆抗体、小鼠抗人 PCNA 单克隆抗体、羊抗鼠 IgG(武汉博士德生物工程有限公司);二甲基亚砜(DMSO)、MTT(美国 Sigma 公司);A77 1726 为苏州长征-欣凯公司惠赠,用不含血清的 DMEM 培养液配制浓度为 5 mmol/L 的浓缩液置于 4℃ 保存,2 周内有效,使用时用含 5% FBS 的 DMEM 培养液稀释成 200 μ mol/L 的工作液。

1.2 方法

1.2.1 HPFs 的培养 采用组织块培养法^[5]原代接种 48~72 h 可观察到细胞从组织块周围爬出,取传代细胞接种于预置盖玻片的 6 孔板,待细胞长满盖玻片,用 4% 多聚甲醛固定、风干后以抗波形蛋白抗体和抗 α -SMA 蛋白抗体行免疫细胞化学鉴定。

1.2.2 MTT 法测定 A77 1726 对 HPFs 增生的影响 取处于对数生长期的 HPFs 以含 3% FBS 的 DMEM 制备为 1×10^5 个/mL 细胞悬液,每孔 200 μ L 分别接种于 4 块 96 孔培养板中,细胞长至单层后,分别在细胞中加入 200 μ L 终浓度为 20、40、60、80、160、200 μ mol/L 的 A77 1726。同时设不加药的阴性对照和只加培养液的空白对照,每组设 6 个复孔。分别培养 24、48、72、96 h 后用 MTT 法于自动酶标读数仪 492 nm 处测定各孔 HPFs 的吸光度值(A 值)。实验重复 3 次,根据 MTT 的吸光度(A)值计算出 MTT 细胞增生抑制率并绘制时间、剂量效应曲线。增生抑制率 = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值 \times 100%。

1.2.3 免疫细胞化学法测定 A77 1726 对 HPFs 增生细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表

达的影响 取对数生长期(第 3~5 代)的细胞,取传代细胞接种于预置盖玻片的 6 孔板,待细胞在玻片上长成单层(约 24 h),加入终浓度分别为 20、40、80、160、200 μ mol/L 的 A77 1726 溶液,设不加药物的阴性对照,从 0~200 μ mol/L 每个浓度 2~3 个孔。培养 24 h,4% 多聚甲醛固定 20 min,免疫组织化学法检测细胞 PCNA 的表达。结果判断:光镜下,每个浓度随机取 20 个高倍视野($\times 400$),要求所选视野细胞生长均匀,以细胞核有棕黄色颗粒物质沉积为阳性细胞,阳性细胞数与该视野细胞总数之比即为阳性指数(positive index, PI)。阳性细胞 $\leq 25\%$ 视野细胞总数者 PI 为 1, 26%~50% 者 PI 为 2, 51%~75% 者 PI 为 3, >75% 者 PI 为 4。评分方法:按染色强度比例将无、弱、中、强、极强分别记为 0~4 分。最后将 PI 和染色强度得分相加,总得分的 0~2 分、3~4 分、5~6 分、7~8 分者分别记为 -、+、++、+++ (二级评分法)^[6]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行分析。计量资料所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, A77 1726 对 HPFs 增生的抑制率以百分数表达。不同浓度 A77 1726 作用不同时间后细胞 MTT 吸光度均值的总体比较采用两因素方差分析,组间的多重比较采用 SNK-q 检验; HPFs PCNA 阳性表达的评分比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPFs 的培养及鉴定

组织块接种后 48~72 h 可观察到有梭形细胞自组织块周边游出,4~5 d 后细胞开始以组织块为中心向四周生长,形成火山口样细胞晕。10 d 左右细胞基本长至 80% 融合,可行传代培养。第 3~10 代 HPFs 生长到 80%~90% 融合后以 1:2 或 1:3 传代,消化传代后 5 h 即可贴壁生长,2~3 d 即可 80%~90% 融合。镜下观察细胞形态,多数为梭形,少数为星形、多角形,胞质透亮、均匀,核居中。体外培养的翼状胬肉细胞经 SAB 染色法可见 α -SMA 蛋白表达阳性,阳性表达位于胞浆,且波形蛋白表达也为阳性,呈现与成纤维细胞长轴方向一致的棕黄色束状或网状结构,结合组织来源和细胞生长特性可以确认为成纤维细胞(图 1)。

2.2 A77 1726 对 HPFs 增生的影响

2.2.1 HPFs 形态学改变 A77 1726 作用 24 h 在相差显微镜下见对照组细胞基本长满培养孔,呈梭状、多角形或星形,排列较整齐,贴壁生长。用药组细胞变圆,排列比较松散,药物浓度较高组,细胞数量明显减少。

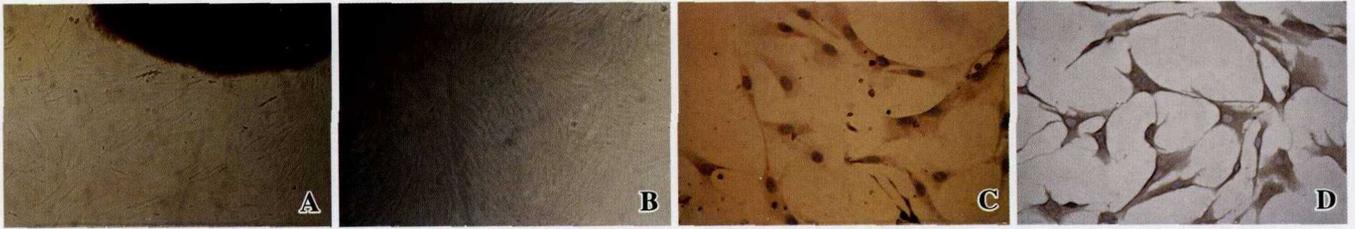


图 1 HPFs 的培养和鉴定 A: 组织块贴壁 72 h, HPFs 从组织块周缘游出 (×200) B: 传代后 3 d, 成纤维细胞可贴壁长满 (×200) C: SAB 法染色 HPFs 的 α -SMA 蛋白表达阳性 (×400) D: SAB 法染色 HPFs 波形蛋白表达阳性 (×400)
 Fig. 1 The culture and identification of HPFs A: 72 hours after the adhesion of cultured pterygium tissue, HPFs grow out from its margin (×200) B: 72 hours after passage, HPFs grow all over on the flask surface (×200) C: Cultured HPFs showed the positive stain for α -SMA (×400) D: Cultured HPFs showed the positive reaction for Vimentin (×400)

2.2.2 MTT 法测定 A77 1726 对 HPFs 增生的影响

A77 1726 浓度 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 时, 能显著抑制 HPFs 增生 ($P < 0.05$)。在 $20 \sim 200 \mu\text{mol/L}$, 抑制强度随浓度升高而加强 ($P < 0.05$)。48 h 时 $80 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ 的 A77 1726 对 HPFs 增生抑制作用显著 ($P < 0.05$); 抑制率达到 79.2% ~ 95.3%, 药物作用时间在 24 ~ 72 h, 抑制强度随时间延长而加强 ($P < 0.05$) (表 1, 2)。按各浓度组细胞增生抑制率绘制时间 - 剂量效应曲线 (图 2)。

表 2 A77 1726 对 HPFs 增生的抑制率 (%)

Table 2 The inhibitory rate of A77 1726 on proliferation of HPFs (%)

Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	Inhibitory rate of A77 1726 proliferation of HPFs in different time			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	—	—	—	—
20	11.5	27.4	68.9	67.1
40	36.5	63.0	80.2	81.2
80	43.8	79.2	91.3	92.6
160	59.7	84.3	88.4	96.6
200	81.1	95.3	97.0	91.6

表 1 A77 1726 处理后 HPFs 的吸光度 ($\bar{x} \pm s, A$ 值)

Table 1 The optic absorbance of HPFs in different treating time of A77 1726 ($\bar{x} \pm s, A$ value)

Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	A value of HPFs in different time			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0.523 ± 0.041	0.518 ± 0.036	0.391 ± 0.055^h	0.268 ± 0.048^h
20	0.462 ± 0.056	0.376 ± 0.037^{bh}	0.121 ± 0.049^{bh}	0.088 ± 0.032^b
40	0.332 ± 0.027^{be}	0.192 ± 0.021^{beh}	0.077 ± 0.031^{bh}	0.050 ± 0.012^{be}
80	0.294 ± 0.015^{be}	0.108 ± 0.020^{beh}	0.033 ± 0.015^{beh}	0.019 ± 0.004^{be}
160	0.210 ± 0.026^{be}	0.081 ± 0.018^{beh}	0.045 ± 0.016^{bh}	0.048 ± 0.009^{beh}
200	0.099 ± 0.030^{be}	0.023 ± 0.016^{beh}	0.012 ± 0.008^{be}	0.022 ± 0.034^b

$F_{\text{dosage}} = 17.916, P < 0.05; F_{\text{time}} = 22.551, P < 0.05; ^b P < 0.05$ vs

respective 0 concentration group; $^e P < 0.05$; intergroup comparison (dosage);

$^h P < 0.05$; intergroup (time) (Two-way ANOVA, SNK-q test)

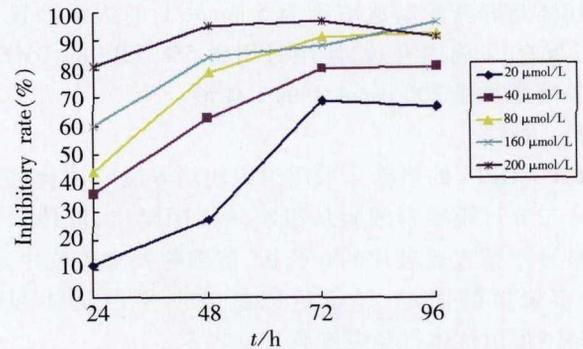


图 2 A77 1726 对 HPFs 增生影响的时间 - 剂量效应曲线

Fig. 2 The effect of A77 1726 on proliferation of HPFs



图 3 不同浓度的 A77 1726 处理 24 h 后 PCNA 在 HPFs 中的表达 A: A77 1726 未处理组 HPFs 中 PCNA 表达呈强阳性 B: $80 \mu\text{mol/L}$ A77 1726 处理 24 h 组 HPFs 中 PCNA 表达较未处理组明显减弱 C: $160 \mu\text{mol/L}$ A77 1726 处理 24 h 组 HPFs 中 PCNA 无表达

Fig. 3 Expression of PCNA in HPFs after treated with A77 1726 A: PCNA showed the stronger expression in untreated HPFs (without A77 1726) B: 24 hours after treated with $80 \mu\text{mol/L}$ A77 1726, the expression of PCNA in HPFs was prominently decreased in comparison with untreated HPFs C: 24 hours after treated with $160 \mu\text{mol/L}$ A77 1726, expression of PCNA in HPFs could hardly be observed

2.3 A77 1726 对 HPFs 的 PCNA 表达的影响

HPFs 的 PCNA 表达: 细胞阳性表达显示为棕黄色、黄色或浅黄色细小均匀颗粒, 分布于整个细胞核; 细胞核无着色 (淡蓝色), 胞浆呈淡黄色者为阴性 (图 3)。以药物浓度对 PCNA 各级积分视野数进行 H 检验, 结果显示药物浓度对 PCNA 表达的强度有明显

影响, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 A77 1726 处理后 PCNA 在 HPFs 中的表达评分

Table 3 Score of PCNA expression in HPFs after treatment of A77 1726

A77 1726 ($\mu\text{mol/L}$)	PCNA score			
	-	+	++	+++
0	0	2	2	16
20	1	1	8	10
40	1	2	13	4
80	2	16	2	0
160	8	11	1	0
200	13	7	0	0

$H = 80.232, P < 0.05$ (Kruskal-Wallis test)

翼状胬肉临床辅助治疗的报道^[8-9]。抗增生药物可以显著降低翼状胬肉术后的复发率, 但也可引起巩膜坏死等并发症^[10]。目前尚无治疗翼状胬肉的特效药物。

LEF 具有免疫调节、抗炎、抗增生、免疫抑制的作用, 口服后形成活性产物 A77 1726, 可逆性地抑制 DHODH 活性, 使活化的淋巴细胞细胞周期被阻止, 进入休眠状态, 还通过抑制酪氨酸激酶活性影响细胞活化过程中信号的传导^[11]。近期证实 A77 1726 还可以通过抑制核因子 κB (NF- κB) 的活化影响外周血单核细胞向病变组织的迁移^[12]。A77 1726 剂量依赖性地抑制细胞增生, B 淋巴细胞最敏感, 上皮细胞、肿瘤细胞、成纤维细胞、巨噬细胞也可被 A77 1726 抑制 ($\text{IC}_{50} = 5 \sim 40 \mu\text{mol/L}$)^[13]。

本研究发现 A77 1726 在浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h 以及 40 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 即对 HPFs 的生长产生抑制作用, 并在一定范围内呈浓度依赖性和作用时间依赖性, 但作用时间达 72 h 时抑制作用无明显差异, 提示 A77 1726 在作用 72 h 时可达作用的平台期。对细胞增生的抑制作用在形态学上表现为细胞数量明显减少、变圆、漂浮细胞增多等改变。

PCNA 作为 DNA 复制时 DNA 聚合酶 δ 的辅酶之一, 直接参与细胞核内 DNA 的合成。PCNA 主要表达在细胞周期的 S 期, 可作为一种比较直观、准确而且操作简便的研究细胞增生状态的观察指标^[14]。在本次研究中, A77 1726 浓度 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 时可明显呈浓度依赖性地抑制 HPFs 中 PCNA 的表达。这与本实验所采用的 MTT 法检测的 A77 1726 对 HPFs 中增生活性的抑制作用结果相符。

我们的实验证明了 LEF 作为一种新型、高效、低毒的免疫调节剂, 还具有良好的抗 HPFs 增生的作用。有报道 A77 1726 抑制程度与 A77 1726 的浓度和细胞

3 讨论

目前, 为预防翼状胬肉手术后复发, 术中或术后应常用抗增生药物如丝裂霉素 C 和 5-氟尿嘧啶^[7], 此外, 也有柔红霉素、阿霉素应用于

的活化状态有关, 且在治疗浓度下 A77 1726 对细胞的抑制作用是可逆的, 不会引起细胞凋亡。A77 1726 的抑制作用解除后, 增生的细胞可以恢复正常, 这种抑制作用还可以被外源性给予的嘧啶核苷酸所逆转^[15]。提示 LEF 有可能作为一种高效、低毒的抗增生药物应用于翼状胬肉的治疗。但本实验仅局限于 LEF 在体外对 HPFs 的作用, 更好地评价该药物对翼状胬肉或其他眼科疾病治疗的有效性及其安全性, 仍有待进一步的研究。

参考文献

- Schmidt A, Sehwind B, Gilich M, et al. Simultaneous determination of leflunomide and its active metabolite, A77 1726, in human plasma by high-performance liquid chromatograph [J]. Biomed Chromatogr, 2003, 17(4): 276 - 281
- 姚宏伟, 李俊, 陈季强, 等. 来氟米特对肝星状细胞增殖和胶原合成的影响 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2004, 33(6): 515 - 518
- Robertson SM, Lang LS. Leflunomide; inhibition of S-antigen induced autoimmune uveitis in Lewis rats [J]. Agents Actions, 1994, 42(3-4): 167 - 172
- Coupland SE, Klebe S, Karow AC, et al. Leflunomide therapy following penetrating keratoplasty in the rat [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1994, 32(10): 622 - 627
- 司徒振强, 吴军正, 刘斌, 等. 细胞培养 [M]. 北京: 世界图书出版公司, 2003: 186 - 187
- 郭志丽, 顾军, 米庆胜, 等. 来氟米特对角质形成细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 10(36): 580 - 582
- Ang LP, Chua JL, Tan DT. Current concepts and techniques in pterygium treatment [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2007, 18: 308 - 313
- Dadeya S, Kamlash SF. Intraoperative daunorubicin to prevent the recurrence of pterygium after excision [J]. Cornea, 2001, 20: 172 - 174
- Sodhi PK, Verma L, Pandey RM, et al. Comparison between the role of intraoperative mitomycin C and doxorubicin in preventing the recurrence of primary pterygium [J]. Ophthalmic Res, 2004, 37: 1 - 6
- Rubinfeld RS, Pfister RR, Stein RM, et al. Serious complications of topical mitomycin-C after pterygium surgery [J]. Ophthalmology, 1992, 99: 1647 - 1654
- Kirsch BM, Zeyda M, Stuhlmeier K, et al. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, interferes with dendritic cell function [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7: 694 - 703
- Grisar J, Aringer M, Koller MD, et al. Leflunomide inhibits transendothelial migration of peripheral blood mononuclear cells [J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63: 1632 - 1637
- Burger D, Begue-Pastor N, Benavent S, et al. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, inhibits the production of prostaglandin E_2 , matrix metalloproteinase 1 and interleukin 6 in human fibroblast-like synoviocytes [J]. Rheumatology, 2003, 42: 89 - 96
- Ohta Y, Ichimura K. Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, Ki67, 5-bromo-2'-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2000, 109: 1046 - 1048
- Cherwinski HM, Byars N, Ballaron SJ, et al. Leflunomide interferes with pyrimidine nucleotide biosynthesis [J]. Inflamm Res, 1995, 44(8): 317 - 322

(收稿: 2008-05-10 修回: 2008-11-22)

(本文编辑: 刘艳)