

# 环孢霉素 A 抑制人视网膜色素上皮细胞增生的体外研究<sup>△</sup>

赵小钊 万光明

## Inhibiting effects of cyclosporine A on proliferation of human retinal pigment epithelium

ZHAO Xiao-Zhao, WAN Guang-Ming

【Key words】 proliferative vitreoretinopathy; human retinal pigment epithelium; cyclosporine A

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of cyclosporine A (CsA) on proliferation of human retinal pigment epithelium (hRPE) cultured *in vitro*. **Methods** The hRPE cells were divided into experimental groups and control group. Control group was still cultured with DMEM fluid, and experimental groups were added with different concentrations of CsA, 0.20 mg · L<sup>-1</sup>, 0.40 mg · L<sup>-1</sup>, 0.80 mg · L<sup>-1</sup>, 1.60 mg · L<sup>-1</sup>, 3.20 mg · L<sup>-1</sup> and 6.40 mg · L<sup>-1</sup>. The relationship between time and effect were determined at 24 hours, 48 hours and 72 hours, respectively. Absorbance A was detected with MTT chromometry. **Results** There was significant difference with absorbency in experimental group with CsA 0.20 mg · L<sup>-1</sup> after 72 hours ( $P < 0.05$ ); When the dose of CsA was higher than 0.40 mg · L<sup>-1</sup> and the time was longer than 24 hours, there was significant difference between the absorbency ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** In certain range, CsA can inhibit the proliferation of hRPE cells cultured *in vitro* in a concentration and time-dependent manner.

[Rec Adv Ophthalmol 2008;28(1):18-20]

【中图分类号】 R774 【文献标识码】 A

【文章编号】 1003-5141(2008)01-0018-03

【关键词】 增生性玻璃体视网膜病变;人视网膜色素上皮细胞;环孢霉素 A

【摘要】 **目的** 观察环孢霉素 A (cyclosporine, CsA) 对体外培养人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞增生的影响作用。 **方法** 取体外培养人 RPE 细胞进行分组实验, 实验分对照组和实验组; 对照组用 DMEM 培养液继续培养; 实验组按所加 CsA 浓度的不同分为 0.20 mg · L<sup>-1</sup>, 0.40 mg · L<sup>-1</sup>, 0.80 mg · L<sup>-1</sup>, 1.60 mg · L<sup>-1</sup>, 3.20 mg · L<sup>-1</sup>, 6.40 mg · L<sup>-1</sup>。时间效应关系分别于 CsA 作用 24 h, 48 h, 72 h 后测定。对照组和实验组均用 MTT 比色法测吸光度 A 值。 **结果** CsA 浓度为 0.20 mg · L<sup>-1</sup> 时, 作用 72 h 后差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); CsA 浓度  $\geq 0.40$  mg · L<sup>-1</sup> 时, 作用 24 h 即差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** CsA 能够抑制体外培养的 RPE 细胞的生长, 这种抑制作用在一定浓度范围内有剂量时间效应。

[眼科新进展 2008;28(1):18-20]

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 为视网膜表面发生无血管的纤维细胞性的膜的增生, 常见于原发性 (孔源性) 视网膜脱离、视网膜脱离复位手术后或眼球穿通伤后。它是引起视网膜再脱离的主要原因, 也是造成许多眼底疾病继续恶化、视力丧失的重要原因, 近年来已经成为眼科研究的热点之一<sup>[1-2]</sup>。PVR 的发病机制目前还未完全清楚, 但其发生发展的病理过程

已经明确。实验及临床观察证明, PVR 的病理发展过程大致分为 3 个阶段, 即炎症反应期、增生期及瘢痕重塑期<sup>[3]</sup>。而视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞的增生则是 PVR 的主要病理特征。所以 PVR 的药物自然也就集中在 RPE 细胞上, 通过某种药物的作用来抑制 RPE 细胞的移行及增生, 也就达到了治疗目的。本文旨在观察环孢霉素 A (cyclosporine A, CsA) 对体外培

作者简介: 赵小钊, 女, 1978 年 12 月出生, 河南安阳人, 硕士, 助教。联系电话: 0371-62576838; E-mail: doctorzxz@sohu.com

About ZHAO Xiao-Zhao: Female, born in December, 1978. Master degree. Teaching Assistant. Tel: +86-371-62576838; E-mail: doctorzxz@sohu.com

收稿日期: 2007-06-14

修回日期: 2007-10-24

本文编辑: 方红玲

△基金项目: 河南省杰出青年基金资助 (编号: 0512000600)

作者单位: 450052 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院眼科 (赵小钊现工作于河南职工医学院眼视光教研室)

通讯作者: 万光明, E-mail: wgm66@tom.com

Received date: Jun 14, 2007

Accepted date: Oct 24, 2007

Foundation item: Henan Province Crackajack Young Foundation (No: 0512000600)

From the Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Zhengzhou University (ZHAO Xiao-Zhao now working at the Department of Eye-Metropia of Henan Employee Hospital), Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Responsible author: WAN Guang-Ming, E-mail: wgm66@tom.com

养人视网膜色素上皮(human RPE, hRPE)细胞增殖作用的影响,从而探讨一种治疗PVR的新疗法。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与设备** CsA (Sigma 公司产品); DMEM 培养基、胰蛋白酶、EDTA (均为 GIBCO 公司产品);胎牛血清(杭州四季青公司产品);四甲基偶氮唑兰(MTT)、二甲基亚砷(DMSO) (均为 Sigma 公司产品);鼠抗人角蛋白抗体(武汉博士德生物公司);倒置显微镜(OLYMPUS CK2 日本);细胞培养箱(3111 S/N 26358-338 美国);酶联免疫检测仪。

### 1.2 方法

**1.2.1 hRPE 细胞培养及鉴定** hRPE 细胞取自角膜移植的供体眼(供体为意外死亡的健康成人),于供体死亡后 12 h 内分离培养:无菌条件下,将眼球置于眼杯之上,角膜缘后 6 mm 环形剪开巩膜,并去除眼前段及玻璃体,同时神经视网膜层随之分离,仅与视盘处附着,自视盘处分离并剪除神经视网膜层,暴露 RPE 层。PBS 液冲洗 3 次,2.5 g · L<sup>-1</sup>胰蛋白酶(或等量的 2.5 g · L<sup>-1</sup>胰蛋白酶和 0.2 g · L<sup>-1</sup>EDTA 混合液)滴入眼杯中(注意不要溢出眼杯,以免消化巩膜),于培养箱中 37 °C 下消化 40 ~ 60 min 后,取出眼杯,弃除消化液。加入胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)并用浓度为 200 g · L<sup>-1</sup>的 DMEM 高糖培养液终止消化,轻轻剥离出 RPE 层,制成悬液移至离心管中,1 000 r · min<sup>-1</sup>, 8 min 后弃上清,再加入 20% 的 DMEM,吹打成悬液,接种于 25 mL 的培养瓶中,放入培养箱(体积分数 5% CO<sub>2</sub>、体积分数 95% 空气、湿度为 90%、温度为 37 °C)中孵育<sup>[4]</sup>。4 ~ 5 d 更换培养液,直至细胞融合传代,按 1 : 2 ~ 3 传代。选第 2 ~ 3 代细胞用于实验,采用链霉亲和素-生物素化过氧化物酶复合物法,一抗为鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体,行免疫细胞化学染色进行细胞鉴定。

**1.2.2 RPE 细胞分组培养** 取 2 ~ 3 代 RPE 细胞以(40 ~ 50) × 10<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>接种于 96 孔培养板中(每孔 200 μL),孵育 24 h 贴壁后,进行分组实验。实验分对照组和实验组,对照组单纯用含 100 g · L<sup>-1</sup>小牛血清的 DMEM 培养液,继续培养;实验组按所加 CsA 浓度的不同分为 0.20 mg · L<sup>-1</sup>、0.40 mg · L<sup>-1</sup>、0.80 mg · L<sup>-1</sup>、1.60 mg · L<sup>-1</sup>、3.20 mg · L<sup>-1</sup>、6.40 mg · L<sup>-1</sup>。时间效应关系分别于 CsA 作用 24 h、48 h、72 h 测定,每个浓度复设 3 孔。

**1.2.3 细胞形态学观察** 倒置显微镜下观察 hRPE 细胞形态,并照相记录。

**1.2.4 RPE 细胞 MTT 实验** 对照组和实验组分别吸出上清液,再加 5 g · L<sup>-1</sup>的 MTT 20 μL 继续培养 4 h 弃上清,加入 DMSO 150 μL,吸出上清液,10 min 后于酶标仪 490 nm 波长下测吸光度 A 值。

**1.3 统计学分析** 实验结果均以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据采用方差分析,均数间的两两比较

采用 LSD 方法,统计学分析采用 SPSS 10.0 软件。

## 2 结果

**2.1 RPE 形态学观察** 原代培养的细胞贴壁后呈圆形或扁平多角形,胞浆内富含黑色素颗粒,胞核圆形,透明。2 ~ 3 周时铺满,此时细胞呈致密排列的六角形。传代 2 ~ 3 次后黑色素颗粒显著减少或消失,细胞呈梭形及不规则形。传代细胞铺满约需 3 ~ 5 d。细胞角蛋白免疫化学染色显示培养细胞胞浆内呈特异棕黄色染色。

**2.2 药物处理后的 RPE 形态学变化** 对照组细胞贴壁生长良好,呈梭形及不规则形,排列均匀。实验组细胞密度减小,单个散在分布,胞浆浓缩,细胞体积缩小。

**2.3 MTT 比色法结果** 不同浓度的 CsA 作用于 hRPE 细胞不同时间后,与对照组比较显示:CsA 浓度为 0.20 mg · L<sup>-1</sup>时,作用 72 h 后差异有统计学意义( $P < 0.05$ );CsA 浓度 ≥ 0.40 mg · L<sup>-1</sup>时,作用 24 h 差异就有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果表明,细胞增殖抑制率随浓度增加和时间延长而升高(见表 1),并且在一定浓度范围内,药物的抑制作用有浓度-时间依赖关系(图 1)。

表 1 不同浓度 CsA 作用于 hRPE 细胞测定的吸光度 A 值

| Different concentration       | Absorbency (A)      |                     |                     |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                               | 24 hours            | 48 hours            | 72 hours            |
| Control group                 | 0.414 3 ± 0.019 0   | 0.487 1 ± 0.022 1   | 0.594 3 ± 0.018 1   |
| 0.20 mg · L <sup>-1</sup> CsA | 0.407 1 ± 0.018 0   | 0.470 0 ± 0.011 6   | 0.560 0 ± 0.016 3 * |
| 0.40 mg · L <sup>-1</sup> CsA | 0.388 6 ± 0.017 8 * | 0.435 7 ± 0.026 4 * | 0.528 6 ± 0.013 4 * |
| 0.80 mg · L <sup>-1</sup> CsA | 0.354 3 ± 0.017 2 * | 0.408 6 ± 0.021 2 * | 0.485 7 ± 0.011 3 * |
| 1.60 mg · L <sup>-1</sup> CsA | 0.302 9 ± 0.028 7 * | 0.368 6 ± 0.024 1 * | 0.408 6 ± 0.032 9 * |
| 3.20 mg · L <sup>-1</sup> CsA | 0.251 4 ± 0.021 9 * | 0.308 6 ± 0.018 6 * | 0.297 1 ± 0.043 5 * |
| 6.40 mg · L <sup>-1</sup> CsA | 0.135 7 ± 0.017 2 * | 0.188 6 ± 0.032 9 * | 0.198 6 ± 0.020 4 * |

Note: \* Compared with control group,  $P < 0.05$

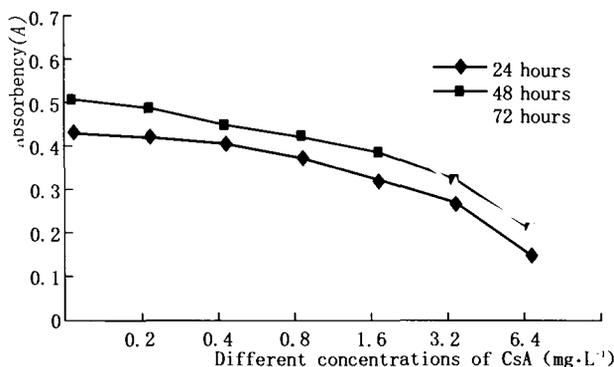


Figure 1 Dose-time manner of CsA on hRPE CsA 作用于 hRPE 的浓度-时间曲线图

## 3 讨论

PVR 的治疗是眼底病研究的热点之一,玻璃体视网膜手术治疗虽然成功率高,但却不能从根本上

抑制细胞的增生。而近年大量研究证实,RPE细胞的增生是PVR的主要病理特征<sup>[2]</sup>,所以很多研究都尝试用药物抑制细胞增生而达到治疗PVR的目的。

CsA是一种环11肽,含有一个新的9碳氨基酸,即甲氨基壬烯醇酸,为环孢素类所特有,是一种强效免疫抑制剂<sup>[5]</sup>。1976年开始广泛应用于器官移植患者术后排斥反应的防治<sup>[6]</sup>,也用于血液病和肾病患者,后来逐渐在眼科用于角膜移植,和一些与免疫有关的眼病,如 Sjögren 综合征、Vogt-小柳原田综合征、Behcet 病等,这些都与 CsA 免疫抑制效应有关<sup>[7]</sup>。

近年来的研究发现,CsA除了具有强大的免疫抑制效应外,还具有抗增生作用,适当的浓度能有效地抑制血管内皮细胞、皮肤成纤维细胞、结膜下成纤维细胞、晶状体上皮细胞的增生<sup>[8]</sup>,而CsA用于治疗PVR的研究相对较少。本文利用体外培养hRPE细胞,观察CsA对hRPE细胞生长的影响,从而探寻一种安全有效的浓度-时间关系,结果显示:当CsA浓度为 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,持续作用72h对hRPE细胞生长有明显抑制作用( $P < 0.05$ );当CsA浓度 $\geq 0.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,作用24h即有明显抑制作用( $P < 0.05$ )。

本研究旨在观察CsA对hRPE细胞增生的影

响,寻求一种PVR治疗的新方法,实验结果也证实,CsA对hRPE细胞的增生有一定的抑制作用,这为CsA在PVR治疗中作用的进一步研究提供实验依据,同时也为临床应用提供一定的理论基础。当然我们仅在体外实验初步证实了CsA对hRPE细胞增生的抑制作用,对于体内实验和临床应用,其确切浓度、药物毒性和用药途径都还需要进一步深入研究。

## 参考文献

- 1 Charteris DG. Proliferative vitreoretinopathy: pathobiology, surgical management, and adjunctive treatment [J]. *Br J Ophthalmol* 1995;79(10):953-960.
- 2 惠延年. 增生性玻璃体视网膜病变: 带入21世纪的课题 [J]. *中华眼底病杂志* 1999;15(2):67-68.
- 3 Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview [J]. *Surv Ophthalmol* 1998;43(1):3-18.
- 4 王雨生. 视网膜色素上皮细胞培养技术及其应用 [J]. *中华眼底病杂志* 1994;10(2):124-128.
- 5 田 萍. 新型强效免疫抑制剂FK506治疗自身免疫性眼病的最新进展 [J]. *眼科新进展 Yanke Xinyinzhan* 2000;20(2):92-93.
- 6 刘昭生. 环孢霉素A缓释剂在眼科的应用 [J]. *国外医学眼科学分册* 2000;24(5):303-307.
- 7 戴 馨, 王铮华. 环孢霉素A抗增殖作用的实验研究 [J]. *眼科新进展 Yanke Xinyinzhan* 2003;23(4):251-253.
- 8 Cortina P, Gomez-Lechon MJ, Navea A. Diclofenac sodium and cyclosporin A inhibit human lens epithelium cell proliferation in culture [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235(3):180-185.

## (上接第17页)

和血管通透性增加,可以通过AO造影和EB定量检测。我们对剂量以及时间点的选择是参考了 Miyamoto 等<sup>[4]</sup>的研究,不同的是本研究的实验动物改用了国内常见的BN大鼠,使得此技术在国内的广泛应用成为可能。由于技术原因,在我们的研究中不能观察到白细胞在视网膜血管内的动态行为改变,希望今后通过技术改进弥补这一缺陷,并结合药物剂量依赖关系,进一步从分子水平阐述产生这种现象的内在原因。

## 参考文献

- 1 Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, Kiryu J, Honda Y. Quantitative evaluation of leukocyte dynamics in retinal microcirculation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(1):123-130.
- 2 Tamura H, Miyamoto K, Kiryu J, Miyabara S, Katsuta H, Hirose F, et al. Intravitreal injection of corticosteroid atten-

uates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(4):1440-1444.

- 3 Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, Kiryu J, Miyamoto K, Matsuda N. Visualization and quantitative analysis of leukocyte dynamics in retinal microcirculation of rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(7):1341-1348.
- 4 Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Moromizato Y, Aiello LP, Ogura Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) [J]. *AM J Pathol* 2000;156:1733-1739.
- 5 王 康, 刘乃慧, 李新民. 不同种系糖尿病大鼠血-视网膜通透性改变对比研究 [J]. *眼科新进展 Yanke Xinyinzhan* 2007;27(1):17-19.
- 6 Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, Murata T, Llermont A, et al. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(7):10836-10841.
- 7 Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El-Benna J, Pocardalo MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils [J]. *Blood* 1997;90(10):4153-4161.