

两种选择性环氧化酶-2 抑制剂对翼状胬肉成纤维细胞生长影响的对比研究

高 媛,程旭康,陈 丹

作者单位:(430022)中国湖北省武汉市第一医院眼科
作者简介:高媛,女,硕士研究生,住院医师,研究方向:眼表疾病。
通讯作者:高媛. gao0477@hotmail. com
收稿日期:2010-05-18 修回日期:2010-06-30

Investigation of two selective cyclooxygenase-2 inhibitors on HPF

Yuan Gao, Xu-Kang Cheng, Dan Chen

Department of Ophthalmology, the First Hospital of Wuhan, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Yuan Gao. Department of Ophthalmology, the First Hospital of Wuhan, Wuhan 430022, Hubei Province, China. gao0477@hotmail. com

Received:2010-05-18 Accepted:2010-06-30

Abstract

• AIM: To investigate the effect of two selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors (nimesulide and meloxicam) on proliferation and apoptosis of human pterygium fibroblasts (HPF) in culture and search for a new method to prevent the recurrence after pterygium surgery.

• METHODS: HPF was incubated with 0-200 μ mol/L nimesulide and meloxicam for 24-96 hours. The MTT method was used to assay the biologic activities of the two drugs in different time and different doses. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in each group was detected by immunohistochemistry method. The cell cycle distribution was measured by flow cytometric analysis.

• RESULTS: Administration of 50 μ mol/L nimesulide or 100 μ mol/L meloxicam for 24 hours significantly inhibited HPF proliferation in a dose-and time-dependent manner ($P < 0.05$). After treated with the two drugs in 100 μ mol/L for 48 hours, there was significant sub- G_1 peak. The number of HPF in G_0/G_1 phase increased, but in S phase decreased ($P < 0.05$), suggesting cells were arrested in G_0/G_1 phase. The nimesulide (25-200 μ mol/L) and meloxicam (50-200 μ mol/L) inhibited the expression of PCNA in HPF in a dose-dependent manner ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Two selective COX-2 inhibitors can significantly inhibit HPF proliferation and induce its apoptosis. The higher selecti on of COX-2 has the stronger inhibition on the growth of HPF.

• KEYWORDS: pterygium; human pterygium fibroblasts; selective cyclooxygenase-2 inhibitor; nimesulide; meloxicam

Gao Y, Cheng XK, Chen D. Investigation of two selective cyclooxygenase-2 inhibitors on HPF. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(8):1497-1499

摘要

目的:观察两种选择性环氧化酶-2(COX-2)抑制剂对体外培养人翼状胬肉成纤维细胞(HPF)增殖和凋亡的影响,并比较两者作用强弱,寻找辅助治疗和预防翼状胬肉复发的新途径。

方法:用0~200 μ mol/L尼美舒利(nimesulide)和美洛昔康(meloxicam)作用体外培养的HPF,24~96h后观察不同浓度的两种药物对HPF的影响。MTT法及免疫组织化学染色增生细胞核抗原(PCNA)检测细胞生长活性,流式细胞仪测定细胞周期时相变化。

结果:在尼美舒利50 μ mol/L作用24h后,美洛昔康100 μ mol/L作用24h后均能显著抑制HPF的增殖($P < 0.05$),呈剂量和时间依赖性。100 μ mol/L尼美舒利和美洛昔康分别作用48h后,流式细胞仪检测结果发现,药物作用组均出现典型的亚二倍体凋亡峰, G_0/G_1 期细胞百分比上升($P < 0.05$),S期细胞百分比下降($P < 0.05$),说明细胞阻滞于 G_0/G_1 期。当尼美舒利的浓度在25~200 μ mol/L,美洛昔康在50~200 μ mol/L范围内能浓度依赖性地抑制细胞表达PCNA($P < 0.05$)。

结论:两种选择性COX-2抑制剂均能抑制HPF的生长,并诱导其凋亡,对COX-2的选择性越高,对HPF的抑制作用越强,尼美舒利的作用强于美洛昔康。

关键词:翼状胬肉;成纤维细胞;选择性环氧化酶-2抑制剂;尼美舒利;美洛昔康

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.08.014

高媛,程旭康,陈丹.两种选择性环氧化酶-2抑制剂对翼状胬肉成纤维细胞生长影响的对比研究.国际眼科杂志2010;10(8):1497-1499

0 引言

翼状胬肉是眼表疾病的常见病,多发病。目前对该病的发病机制还不是特别清楚,甚至不同学说之间还存在矛盾。临床治疗疗效也不尽如人意,复发率较高。因此探讨翼状胬肉的发病机制并寻找出有效的,毒副作用少的药物抑制其发生发展,降低其复发率已经成为大家所关注的话题。环氧化酶-2(COX-2)在炎症发生和肿瘤细胞增殖中的作用已经受到越来越多的重视,而有研究发现翼状胬肉成纤维细胞(HPF)中也存在COX-2的表达。我们探讨选择性COX-2抑制剂尼美舒利(nimesulide)和美洛昔康(meloxicam)对体外增殖的成纤维细胞抑制作用,并对两种药物进行比较,为其用于翼状胬肉的治疗和术后预防复发提供前期实验资料。

表1 尼美舒利和美洛昔康对 HPF 增殖的影响

药物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	尼美 24h		美洛 24h		尼美 48h		美洛 48h	
	A 值	抑制率%	A 值	抑制率%	A 值	抑制率%	A 值	抑制率%
0	0.412 \pm 0.022	-	0.412 \pm 0.022	-	0.354 \pm 0.010	-	0.354 \pm 0.010	-
25	0.383 \pm 0.003	7	0.401 \pm 0.005 ^e	2.7	0.296 \pm 0.013 ^b	16.4	0.320 \pm 0.002 ^{b,e}	9.5
50	0.361 \pm 0.007 ^{a,c}	12.4	0.390 \pm 0.007 ^e	5.3	0.249 \pm 0.007 ^{b,c}	29.7	0.299 \pm 0.012 ^{b,e}	15.5
100	0.308 \pm 0.011 ^{b,c}	25.2	0.364 \pm 0.023 ^{b,c}	11.7	0.212 \pm 0.003 ^{b,c}	40.1	0.242 \pm 0.008 ^{b,c,e}	31.6
200	0.199 \pm 0.009 ^{b,c}	51.7	0.291 \pm 0.011 ^{b,c,e}	29.4	0.098 \pm 0.020 ^{b,c}	72.3	0.187 \pm 0.005 ^{b,c,e}	47.2

药物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	尼美 72h		美洛 72h		尼美 96h		美洛 96h	
	A 值	抑制率%	A 值	抑制率%	A 值	抑制率%	A 值	抑制率%
0	0.325 \pm 0.005	-	0.325 \pm 0.005	-	0.293 \pm 0.011	-	0.293 \pm 0.011	-
25	0.233 \pm 0.011 ^b	31.4	0.269 \pm 0.014 ^{b,e}	17.2	0.192 \pm 0.005 ^b	34.5	0.220 \pm 0.007 ^{b,e}	24.9
50	0.148 \pm 0.006 ^{b,c}	54.5	0.243 \pm 0.005 ^{b,c,e}	25.2	0.113 \pm 0.021 ^b	61.4	0.171 \pm 0.003 ^{b,c,e}	41.6
100	0.141 \pm 0.012 ^b	56.6	0.202 \pm 0.010 ^{b,c,e}	37.8	0.065 \pm 0.006 ^b	77.8	0.135 \pm 0.017 ^{b,c,e}	53.9
200	0.041 \pm 0.002 ^{b,c}	87.4	0.116 \pm 0.004 ^{b,c,e}	64.3	0.052 \pm 0.003 ^b	82.3	0.078 \pm 0.003 ^{b,c,e}	73.4

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$ vs 同种药物与临近低浓度组; ^e $P < 0.05$ vs 尼美相同浓度相同时间。

1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂: DMEM 培养基, 新生牛血清, 胰酶为 Gibco 公司产品。DMSO, MTT, 尼美舒利, 美洛昔康为 Sigma 公司产品。小鼠抗人角蛋白及波形蛋白单克隆抗体, 小鼠抗人 PCNA 单克隆抗体, 羊抗鼠 IgG 为武汉博士德公司产品。仪器设备: SHEL LAB CO₂ 培养箱 (Sheldon 公司), 倒置显微镜 (OLYMPAS), DG-3022A 型酶联免疫检测仪, 流式细胞仪 (FACS, 美国 BD 公司)。

1.2 方法 实验可分为如下步骤: (1) 体外细胞培养: 利用组织块培养法采用含 200g/L 小牛血清的 DMEM 培养基将细胞常规培养于温箱中。待原代贴壁培养生长至基本汇满培养瓶瓶底时用 2.5g/L 的胰酶消化, 按 1:2 的继续传代培养, 取第三代或第四代细胞用于实验。制备细胞爬片, SP 法染色进行鉴定。(2) 尼美舒利和美洛昔康对 HPF 的影响: 将消化好的第四代 HPF 按 $4 \times 10^4/\text{mL}$ 转移到 96 孔板内, 共设六组, 每组设复孔 4 孔, 培养 24h 待细胞贴壁后加药。尼美舒利设阴性对照组, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$, 另一组为空白对照用于调零。分别继续培养 24, 48, 72, 96h。吸去上清, 各孔加 MTT 20 μL , 孵育 4h, 加 120 μL DMSO, 振荡后用酶标仪测 490nm 处吸光度值 (A)。美洛昔康方法及浓度同上, 实验组细胞抑制率 (Inhibitory Rate, IR) = (阴性对照组平均 A 值 - 处理组平均 A 值) / 阴性对照组平均 A 值 $\times 100\%$ 。(3) 流式细胞仪检测细胞周期分布及调亡情况: 取 100 $\mu\text{mol/L}$ 尼美舒利和美洛昔康分别处理 48h 后的实验组及对照组 (不加药) 细胞, 每组各 3 瓶标本, PBS 洗涤后, 加入 700mL/L 冷乙醇固定, 离心后 PI 染液 4 $^{\circ}\text{C}$ 染色 30min, 用流式细胞仪检测, 选用 488nm 激发波长测定样本。(4) PCNA 的检测: 做 6 孔板细胞爬片后用 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的尼美舒利和美洛昔康分别作用 48h, 对照组不加药。免疫组织化学 SABC 法染色检测 PCNA 的表达。随机计数 (放大倍率 20×10) 100 个细胞数出全部阳性细胞及阴性细胞并列列表。

统计学分析: 本实验数据均以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数之间的比较采用两样本比较的 t 检验, 用 SPSS 10.0 软件包处理数据。

2 结果

2.1 HPF 免疫组织化学鉴定 体外培养的翼状胬肉细胞经 SP 法染色可见波形蛋白表达阳性, 阳性表达位于胞质, 呈现与

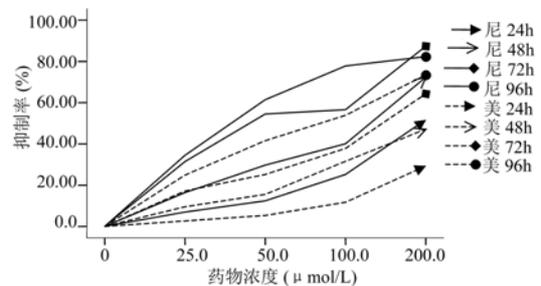


图1 不同浓度尼美舒利和美洛昔康对 HPF 的抑制作用。

表2 FCM 分析 100 $\mu\text{mol/L}$ 尼美和美洛作用 48h 对细胞周期的影响

药物	细胞周期时像		
	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M
阴性对照	44.72 \pm 0.62	30.12 \pm 1.15	11.09 \pm 0.95
尼美舒利	59.21 \pm 0.60 ^a	21.97 \pm 0.86 ^a	12.17 \pm 0.14
美洛昔康	51.33 \pm 1.08 ^{a,c}	26.38 \pm 0.50 ^{a,c}	11.75 \pm 0.21

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$ vs 尼美舒利。

成纤维细胞长轴方向一致棕黄色束状或网状结构; 细胞角蛋白表达阴性。

2.2 尼美舒利和美洛昔康对 HPF 增生的影响 MTT 结果见表 1, 对照组细胞增殖旺盛, 密集, 束状排列, 形态规则, 胞体饱满, 用药组细胞胞体缩小, 形态不规则, 胞间隔宽, 高剂量组细胞明显减少。尼美舒利 50 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24h, 美洛昔康 100 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24h 后均能显著抑制 HPF 的增殖, 两种药物同浓度同时间作用均有差异。尼美舒利和美洛昔康对 HPF 增殖的抑制均呈剂量和时间依赖性见图 1, 尼美舒利的抑制作用明显强于美洛昔康。

2.3 尼美舒利和美洛昔康对细胞周期的影响 流式细胞仪的结果见表 2, 两种药物作用后, 均可见 G₀/G₁ 期细胞百分数增加, S 期细胞百分数减少, 说明细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 进入 DNA 合成期的细胞减少。

2.4 尼美舒利和美洛昔康对细胞表达 PCNA 的影响 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、胞质呈淡黄色者为阴性。当尼美舒利浓度 $\geq 25 \mu\text{mol/L}$, 美洛昔康浓度 $\geq 50 \mu\text{mol/L}$ 即能浓度依赖性的抑制 HPF 表达 PCNA ($P < 0.05$), 两组药之间有显著差异, 且尼美舒利的作用强于美洛昔康 (表 3)。

表 3 48h 尼美舒利和美洛昔康对 HPF 表达 PCNA 的影响

药物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	PCNA 表达细胞数				标记指数(%)	
	尼美		美洛		尼美	美洛
	(-)	(+)	(-)	(+)		
0	12	88	12	88	88	88
25	28	72	17	83	72 ^a	83
50	43	57	25	75	57 ^{a,e}	75 ^{a,c}
100	59	41	39	61	41 ^{a,e}	61 ^{a,c,e}
200	79	21	60	41	51 ^{a,e}	40 ^{a,c,e}

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组, ^c $P < 0.05$ vs 尼美舒利相同浓度, ^e $P < 0.05$ vs 同种药物临近低浓度。

3 讨论

翼状胬肉是局部球结膜纤维血管组织呈三角形膜样增生而侵犯角膜的一种眼表疾病,单眼或双眼受累。不仅直接影响美观,还可由于牵拉而引起眼部不适及角膜散光,严重者影响视力及不同程度地影响眼球运动。Hill 等^[1]通过病理研究发现翼状胬肉的主要成分是成纤维细胞,细胞的异常增殖和新生血管的生成导致相应的病变。成纤维细胞在翼状胬肉发病机制中起免疫原始靶细胞的作用。角膜缘干细胞移植加羊膜移植虽能有效降低复发率,但也不能彻底解决该问题。一些辅助疗法,对于本病的治疗及复发的防治取得了一定效果,但并不十分理想,有时还会出现严重的并发症。所以,寻找安全有效的药物来抑制 HPF 的增殖是许多学者所面临的研究课题。环氧化酶(cyclooxygenase, COX)又名前列腺素内过氧化物合成酶,是前列腺素合成的限速酶,它能将花生四烯酸催化合成各种前列腺素产物,后者参与维持机体各种生理和病理过程。环氧化酶有两种同工酶 COX-1 和 COX-2, COX-1 是一种持续表达的结构型酶,被喻为“管家酶”,在大多数正常组织中稳定表达,参与机体正常生理过程和保护功能。而 COX-2 是诱导型酶,在生理状态下 COX-2 在多数组织中处于静息状态或低表达,而在病理情况下,当细胞接受相应的刺激如生长因子、细胞因子(IL-1, TNF, TGF, PDGF, PAF)、血清脂多糖(LPS)、促肿瘤剂(如佛波酯等)、内皮素、高渗状态等^[2]时, COX-2 的 mRNA 和蛋白很快增加,活性增高,参与炎症、损伤、修复、新生血管的生成及肿瘤的生长和转移。近年来, COX-2 在眼部疾病发生发展中的作用被越来越多的学者所重视。眼部疾病中,角膜炎,翼状胬肉,虹膜炎,青光眼,白内障,糖尿病视网膜病变,早产儿视网膜病变中均可见 COX-2 的异常表达。COX-2 参与眼部炎症和新生血管的形成^[3-8]。选择性 COX-2 抑制剂在抑制致炎前列腺素合成的同时并不抑制生理性前列腺素的合成^[9],因此这类药物用于治疗时不良反应很少,近年来被广泛的应用于临床。COX-2 抑制剂可能是通过抑制 COX-2 减少 PGE2 的生成以及降低 MAPK (ERK2) 的活性^[10],从而抑制细胞的增殖。本实验结果显示尼美舒利和美洛昔康均能显著抑制 HPF 的增殖,而且呈剂量和时间依赖性。这两种选择性 COX-2 抑制剂,因其化学结构不同,对 COX-2 的选择性也有所不同。有文献报道尼美舒利对 COX-2 选择性抑制的强度是美洛昔康的 8 倍^[11],对 COX-2 的选择性更高。本实验结果显示尼美舒利对 HPF 的抑制作用是强于美洛昔康的,这表明 COX-2 抑制剂对 HPF 生长的抑制作用主要是通过抑制 COX-2 而实现的。流式细胞仪检测到两种药物作用后, G₀/G₁ 期细胞百分数增加, DNA 合成减少,从而引起细胞

的凋亡。选择性 COX-2 抑制剂诱导凋亡的可能机制包括抑制 PGE2 的生成,下调 bcl-2 蛋白,抑制突变的 H-ras, K-ras 的水平,上调 caspase-3 的活性,抑制 I κ B- α 的磷酸化,抑制 TNF- κ B 的激活,促 TNF- α 诱导的细胞凋亡^[12]。PCNA 是一种酸性细胞周期蛋白,是 DNA 聚合的辅助因子,细胞内外的增殖信号必须经过 PCNA 参与才能引发 DNA 的合成^[13]。因此, PCNA 主要反映了细胞的增殖能力,已被认为是一种准确,直观,简便的衡量细胞增生状况的指标。经两种选择性 COX-2 抑制剂作用, HPF 中 PCNA 的表达下降,表明 HPF 增殖减慢,生长受到抑制,高选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利对 PCNA 表达的抑制作用明显一些,与 MTT 和流式细胞仪结果一致。

本实验表明选择性 COX-2 抑制剂在治疗翼状胬肉方面有适用前景,但是也不能忽略 COX-2 可能在炎症转归和损伤修复中可能存在着正性的作用,如何把握好两者间的平衡点,更好的利用 COX-2 抑制再生,促进修复是有待解决的问题。

参考文献

- Hill JC, Maske R. Pathogenesis of pterygium. *Eye* 1989;3:218-226
- Zhang F, Warskulat U, Wettstein M, et al. Hyperosmolarity stimulates prostaglandin synthesis and cyclooxygenase-2 expression in activated rat liver macrophages. *Biochem J* 1995;312:135-143
- Sellers RS, Silverman L, Khan KN. Cyclooxygenase-2 expression in the cornea of dogs with keratitis. *Vet Pathol* 2004;41(2):116-121
- Tuo J, Tuailon N, Shen D, et al. Endotoxin-induced uveitis in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(7):2306-2313
- Marshall JL, Stanfield KM, Silverman L, et al. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in glaucomatous dog eyes. *Vet Ophthalmol* 2004;7(1):59-62
- 孔玮,张劲松,张雪岩. 环氧化酶-2 在 bFGF 诱导的人晶体上皮细胞增殖中的表达. *中华实用眼科杂志* 2004;12(22):964-968
- Ayalasomayajula SP, Kompella UB. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits retinal vascular endothelial growth factor expression and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic rat model. *Eur J Pharmacol* 2003;458(3):283-289
- Wilkinson-Berka JL, Alousis NS, Kelly DJ, et al. COX-2 inhibition and retinal angiogenesis in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(3):974-979
- 李晓东. 第二代 COX-2 抑制剂. *世界临床药物* 2003;11(24):677
- Husain SS, Szabo IL, Pai R, et al. MAPK (ERK2) kinase-a key target for NSAIDs- induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth. *Life Sci* 2001;69:3045
- 傅得兴,何笑蓉. 选择性环氧化酶-2 抑制剂尼美舒利的药理及临床应用. *中国药学杂志* 1998;33(9):561
- McDade TP, Perugini RA, Vittimberga FJ Jr, et al. Salicylates inhibit NF- κ B activation and enhance TNF- α -induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 1999;83:56
- Tsurimoto T. PCNA, a multi-function ring on DNA. *Biochim Biophys Acta* 1998;26:110