

小檗胺抑制兔 Tenon 囊和滤过道内成纤维细胞增殖的实验研究

张俊芳, 顾宏卫, 秦 柏, 陆 宏, 胡健艳, 管怀进

作者单位:(226001) 中国江苏省南通市, 南通大学附属医院眼科
作者简介:张俊芳, 硕士, 讲师, 研究方向:青光眼。
通讯作者:陆宏, 博士, 副教授, 研究方向:白内障、青光眼。 adanlu2000@yahoo. com. cn
收稿日期:2011-03-02 修回日期:2011-04-27

Berberamine inhibits proliferation of fibroblasts in rabbit Tenon's capsule *in vitro* and filtering channel *in vivo*

Jun-Fang Zhang, Hong-Wei Gu, Bai Qin, Hong Lu, Jian-Yan Hu, Huai-Jin Guan

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hong Lu, Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. adanlu2000@yahoo. com. cn

Received:2011-03-02 Accepted:2011-04-27

Abstract

• AIM: To investigate the inhibitory effects of berberamine on fibroblasts in Tenon's capsule and filtering channel of rabbits.

• METHODS: Rabbit Tenon's capsule fibroblasts were treated with berberamine at different concentrations (0-100mg/L) for different hours. CCK8 assay was used to determine proliferation inhibition of rabbit Tenon's capsule fibroblasts. Flow cytometry was performed to examine cell cycle profile and cell apoptosis rate in response to berberamine treatment. Conjunctive and sclera of filtering area of the rabbits suffered trabeculectomy were examined by pathologic histology examination.

• RESULTS: Berberamine inhibited the proliferation of rabbit Tenon's capsule fibroblasts in a dose-and time-dependent manner. Flow cytometric analysis revealed that Tenon's capsule fibroblasts treated by berberamine were arrested at G1 phase and apoptotic cells increased from 0.64% to 31.86% after treatment with berberamine at 20mg/L for 9 hours ($P < 0.01$). HE stain showed fibroblasts in filtering channel of rabbit were inhibited significantly by berberamine.

• CONCLUSION: Berberamine could inhibit the growth of fibroblasts *in vitro* and *vivo* in rabbit Tenon's capsule and filtering channel. The induction of cell apoptosis might be one of the mechanisms for suppressing the growth of fibroblasts.

• KEYWORDS: berberamine; glaucoma; Tenon's capsule

fibroblasts; trabeculectomy; apoptosis

Zhang JF, Gu HW, Qin B, et al. Berberamine inhibits proliferation of fibroblasts in rabbit Tenon's capsule *in vitro* and filtering channel *in vivo*. *Gujī Yanke Zazhi(Int J Ophthalmol)* 2011;11(6):966-969

摘要

目的:研究钙调素拮抗剂小檗胺(berberamine, BER)对兔 Tenon 囊成纤维细胞和兔小梁切除术后滤过道内成纤维细胞增殖的抑制作用。

方法:体外培养兔 Tenon 囊成纤维细胞,经不同浓度 BER 处理不同时间后,细胞计数 Kit8(CCK8)法检测 BER 对兔 Tenon 囊成纤维细胞增殖的抑制作用,流式细胞仪检测其凋亡率及细胞周期的变化。HE 染色检测 BER 对兔小梁切除术后滤过道内成纤维细胞增殖的抑制作用。

结果:兔 Tenon 囊成纤维细胞经不同浓度 BER 处理不同时间后细胞增殖受到抑制,并呈时间剂量依赖性。流式细胞仪检测发现 BER 处理后兔 Tenon 囊成纤维细胞呈现 G1 期阻滞,细胞凋亡率明显增加,20mg/L BER 处理 9h,细胞凋亡率从 0.64% 增加到 31.86%。HE 染色显示 BER 显著抑制兔小梁切除术后滤过道内成纤维细胞的增殖。

结论:小檗胺在体内外均能抑制成纤维细胞的增殖,其可能是通过诱导细胞凋亡方式抑制兔 Tenon 囊和滤过道内成纤维细胞的增殖。

关键词:小檗胺;青光眼;Tenon 囊成纤维细胞;小梁切除术;凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.06.009

张俊芳,顾宏卫,秦柏,等.小檗胺抑制兔 Tenon 囊和滤过道内成纤维细胞增殖的实验研究.国际眼科杂志 2011;11(6):966-969

0 引言

青光眼是一组以特征性视神经萎缩和视野缺损为特征的不可逆性致盲眼病,是世界范围内第二大致盲眼病。滤过手术是目前青光眼治疗的主流手术方法,然而如何有效抑制滤过手术后滤过道的瘢痕形成,维持功能性滤过泡是影响青光眼手术效果的关键因素。目前临床上术中、术后常辅助抗瘢痕形成的药物如免疫抑制剂、抗代谢药物等,对提高手术成功率起到一定作用,但药物的毒副作用限制了其临床使用。寻找新的、高效、低毒副作用的抑制滤过术瘢痕形成的药物具有现实的临床意义。小檗胺(berberamine, BER)是从我国中草药小檗属植物中提取的一种双苕基异喹啉类生物碱,作为升白细胞药已长期应用于临床,副作用极小,在体外能够抑制多种肿瘤细胞增殖^[1-6],其在眼科的应用报道较少。本实验研究小檗胺在体内外对成纤维细胞增殖是否具有抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年白色家兔 10 只,雌雄各半,体质量 2.5 ± 0.2 kg,无眼部疾患,由南通大学实验动物中心提供。其中 2 只用于 Tenon 囊成纤维细胞培养,其余 8 只随机分为两组,生理盐水组(NS 组)和小檗胺组(BER)。BER 购自西安清禾生物科技有限公司,用生理盐水配制成 200mg/L 储存液,-20℃ 保存备用,使用前用 DMEM 培养液调至所需浓度。DMEM 购自 Gibco BRL 公司。CCK8 试剂盒购自日本 Dojindo。

1.2 方法

1.2.1 兔 Tenon 囊成纤维细胞培养 兔空气栓塞处死后立即摘出眼球,先用 PBS 液将眼球漂洗除去沾染的血块,再用 1:1000 庆大霉素生理盐水冲洗,置超净工作台无菌操作,取结膜下筋膜囊组织。将取下的兔结膜下筋膜囊组织剪切成 $0.5\text{mm} \times 0.5\text{mm} \times 0.5\text{mm}$ 大小碎块,置入培养瓶中,用无菌眼科镊将其均匀贴铺于瓶底,在瓶内加含 150mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液 3mL,以不淹没组织块为度。盖好瓶盖,置 37℃ 50mL/L CO_2 温箱培养,1wk 后第 1 次换液,以后每周换液 2 次,倒置显微镜下观察细胞生长情况,培养至细胞铺满瓶底消化传代。

1.2.2 CCK8 法检测细胞增殖抑制情况 选取 4~6 代对数生长期细胞,调整细胞浓度 1×10^5 /L 接种于 96 孔板,每孔细胞数为 2×10^4 ,培养过夜。实验分为实验组和对照组,实验组分别加入不同浓度(5, 10, 20, 40, 60, 80, 100mg/L)小檗胺 100 μ L 和不含血清的 DMEM 培养液 100 μ L,对照组加入 NS 100 μ L 和不含血清的 DMEM 培养液 100 μ L,每组 3 个平行孔。继续培养 3, 6, 9h。到时间点后每组加入 10 μ L 的 CCK8 试剂,置于 37℃ 培养箱继续培养 4h,选择 450nm 波长,酶标仪测定各孔的吸光度(A)值。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期 10mg/L 小檗胺分别加入 3, 6, 9h 后,收集处理后的包括贴壁和悬浮的兔 Tenon 囊成纤维细胞,用 PBS 调细胞浓度为 10^9 /L,取 1mL 单细胞悬液,离心、漂洗,700mL/L 乙醇 1mL 固定细胞,再用 PBS 漂洗。单细胞样本中加入 200 μ L Rnase I(1g/L),37℃ 孵育 30min,再加入 800 μ L PI 染色液混匀后 4℃ 避光染色 30min,应用流式细胞仪测定细胞凋亡。以正常人的外周血淋巴细胞为正常二倍体标准,根据测定的 DNA 组方图,以 lysis II 软件分析兔 Tenon 囊成纤维细胞的凋亡率。

1.2.4 动物模型及给药 100mL/L 水合氯醛耳缘静脉注射麻醉(300mg/kg),0.5% 丙比卡因结膜表面麻醉 2 次,右眼常规小梁切除术。麻醉后,常规消毒,置开睑器,做以上方穹隆部为基底的结膜瓣,制作 1/2 厚度板层巩膜瓣 $4\text{mm} \times 5\text{mm}$,剥离至透明角膜缘内约 1mm,切除小梁约 $1\text{mm} \times 2\text{mm}$,切除周边虹膜约 $2\text{mm} \times 2\text{mm}$,呈三角形。BER 组于手术中、术后 1, 3, 5d 结膜下注射 100mg/L 小檗胺 0.5mL,NS 组注射无菌 NS 0.5mL。

1.2.5 术后滤过泡观察及病理组织学检查 术后于裂隙灯下观察兔眼结膜瓣愈合情况、结膜是否充血、角膜透明度、晶状体有无混浊、虹膜周切口、滤过泡的形成以及维持情况,并照相。术后 14, 28d 每组分别处死 2 只兔,摘除眼球,剪取滤过泡及其附近的结膜巩膜组织,大小约 $8\text{mm} \times 6\text{mm}$,40g/L 甲醛固定,冰冻切片,HE 染色,光学显微镜下观察滤过道组织的炎症细胞、纤维细胞组织增生情况及滤过道的通畅情况。

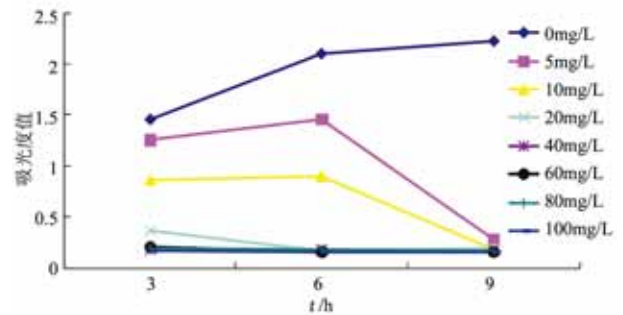


图 1 不同浓度 BER 处理兔 Tenon 囊成纤维细胞不同时间的细胞活力。

表 1 BER 诱导原代培养的兔 Tenon 囊成纤维细胞凋亡的作用 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	凋亡率		
	3h	6h	9h
NS 组	0.017 ± 0.015	0.62 ± 0.035	0.64 ± 0.047
10mg/L	2.34 ± 0.58	3.87 ± 0.37	20.39 ± 0.79
20mg/L	17.65 ± 0.81	23.14 ± 1.65	31.86 ± 1.32

统计学分析:数据采用 STATA 7.0 统计软件分析,计量资料多样本均数比较进行方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小檗胺对原代培养的兔 Tenon 囊成纤维细胞增殖的抑制作用 经不同浓度 BER 作用后,原代培养的兔 Tenon 囊成纤维细胞的存活率随药物浓度的增加而逐渐下降,具有明显的浓度依赖性。各浓度 BER 随着作用时间的延长,原代培养的兔 Tenon 囊成纤维细胞的存活率明显减少,具有明显的时间依赖性,各组间差异有统计学意义($F = 366.21, P < 0.01$,图 1)。

2.2 小檗胺对原代培养的兔 Tenon 囊成纤维细胞细胞周期和凋亡的影响 BER 处理原代培养的兔 Tenon 囊成纤维细胞 G_1 期细胞比例明显增多,S 期细胞比例下降。10mg/L 和 20mg/L BER 作用原代培养的兔 Tenon 囊成纤维细胞 3h, 6h 和 9h 后细胞凋亡率明显增加,且有时间依赖性(表 1)。

2.3 小檗胺对小梁切除术后滤过泡的影响 两组手术动物结膜伤口均愈合良好,术后 7d NS 组结膜充血较 BER 组明显,术后 28d 两组均无充血。各时间点均无房水闪辉、晶状体混浊。NS 组 7d 时滤过泡扁平局限,28d 滤过泡消失。BER 组 7d 时滤过泡弥散隆起,28d 滤过泡色稍白,较大,轻压后滤泡隆起,弥散好,滤泡周围结膜色正常(图 2)。

2.4 兔小梁切除术后滤过区的病理组织学改变 术后 14d 病理组织学显示 NS 组见炎症细胞浸润,纤维细胞大量增生,排列紊乱,滤过道内大量增生的瘢痕组织,而 BER 组炎症细胞较少,组织结构疏松,纤维排列整齐,滤过道通畅,结膜下组织较薄(图 3)。

3 讨论

钙调素(calmodulin, CaM)是细胞内 Ca^{2+} 的主要受体,钙离子信号系统的初级转导者,对细胞多种生理和代谢功能具有调节作用。已有研究表明, CaM 在细胞周期中呈现出规律性的变化,在 G_1 初期水平最低, G_1 晚期开始合成,

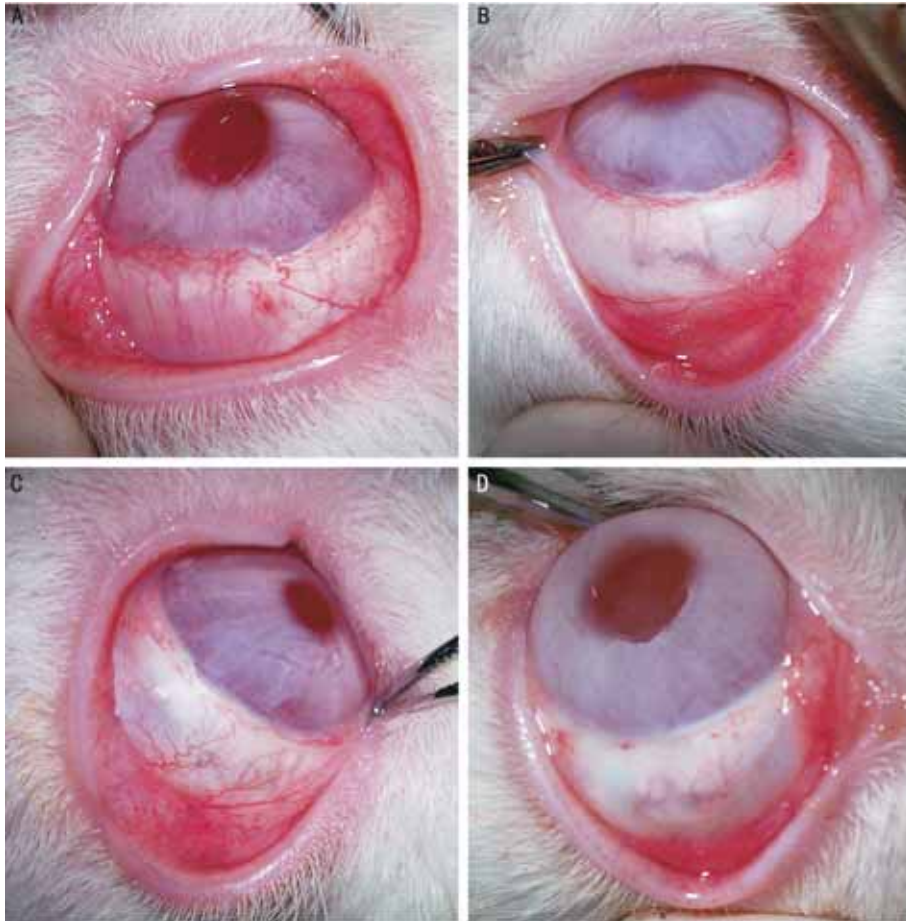


图2 BER对兔小梁切除术后结膜和滤过泡的影响 A: NS组术后7d; B: NS组术后28d; C: BER组术后7d; D: BER组术后28d。

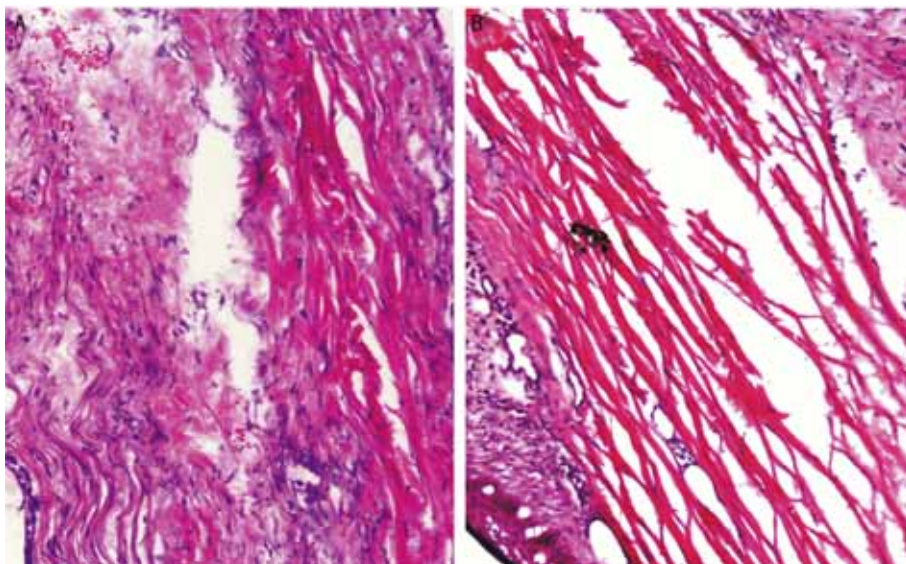


图3 BER对兔小梁切除术后滤过通道内成纤维细胞增殖的影响(HE × 100) A: NS组术后14d滤过通道 HE染色; B: BER组术后14d。

经S期到G₂/M期达到最大,细胞分裂后CaM恢复到G₁初期水平。CaM的高表达能启动DNA的合成,并能缩短G₁和G₂期,最终使细胞周期缩短。CaM拮抗剂可阻断CaM的促进细胞分裂活性,抑制细胞增殖。

BER是从我国中草药小檗属植物中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱,是一种天然的CaM拮抗剂。BER能促进造血功能,增加末梢血白细胞,而且无明显毒副作用。最近许多研究发现,BER可以抑制多种肿瘤细胞如白血

病细胞^[1-3]、骨髓瘤细胞^[4]、乳腺癌细胞、纤维瘤细胞^[5]、肺癌细胞^[6]增殖,又可诱导细胞周期阻滞和凋亡。BER的抗增殖作用主要通过诱导细胞凋亡实现,其可能通过如下几个方面的机制诱导细胞的凋亡。(1)NF-κB通路: NF-κB是真核细胞浆中广泛存在的转录因子,可通过调控细胞因子的基因表达而间接地抑制自身及其它细胞凋亡或增殖。BER可以上调A20,下调IKK-α和IκBα,抑制p65的核转位,降低NF-κB活性,从而降低NF-κB靶分子cyclinD1,

Bcl-x(L), Bid 和 survivin 的表达, 诱导细胞凋亡^[1,4]。(2) survivin 调节通路: survivin 是凋亡抑制蛋白家族的新成员, 可能主要通过两条途径来抑制细胞凋亡: 第一是直接抑制凋亡终末效应酶 caspase-3 和 caspase-7 的活性来阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程; 第二是 survivin 与周期蛋白激酶 CDK4 和 CDK2 相互作用阻断凋亡信号转导通路。研究表明, BER 在体外能抑制 survivin 表达, 激活 caspase-3 和 caspase-9 活性, 降低线粒体膜电位诱导细胞凋亡^[2-4]。caspase 的广谱抑制剂 z-VAD-fmk 可以阻断 BER 的诱导凋亡作用^[7,8]。(3) 激活 GADD45/JNK 通路: GADD45 基因家族是一种重要的 DNA 损伤修复和凋亡诱导基因, 在细胞生长的负性调节中起了重要的作用。GADD45 蛋白可以结合 MEKK4 的 N 末端结构域, 活化 JNK 信号通路, 抑制细胞克隆转化。小檗胺可以通过上调 GADD45 基因表达和 JNK 通路的关键分子 p-jun 和 c-jun 表达抑制多发性骨髓瘤细胞增殖^[9]。(4) 其它: BER 可以下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-x(L), 上调促凋亡蛋白 Bax 和细胞色素 C 诱导凋亡^[10]。

本研究结果提示, 小檗胺在体外可以抑制原代培养的兔 Tenon 囊成纤维细胞并诱导其凋亡, 在体内可以抑制兔小梁切除术后滤过道内成纤维细胞增殖, 并能减轻炎症细胞的浸润, 维持滤过泡的稳定。小檗胺具有亲脂性, 其盐类易溶于水, 分子量小于 600, 容易透过结膜和角膜, 局部应用方便, 具有开发滴眼液剂型的潜力。既往研究表明其滴眼剂具有显著的防治糖尿病性白内障的作用^[11]。综上所述, 小檗胺在体内外能有效抑制成纤维细胞的增殖, 维持滤过道通畅, 有应用于滤过性手术的前景, 其作用机制和安全性有待进一步的研究。

参考文献

1 Wei YL, Xu L, Zhao XY. Mechanism related to inhibition of leukemia

K562 cells by berbamine. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2009; 38(4): 387-391

2 Zhao XY, He ZW, Wu D, et al. Berbamine selectively induces apoptosis of human acute promyelocytic leukemia cells via survivin-mediated pathway. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120(9): 802-806

3 He ZW, Zhao XY, Xu RZ, et al. Effects of berbamine on growth of leukemia cell line NB4 and its mechanism. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006; 35(2): 209-214

4 Liang Y, Xu RZ, Zhang L, et al. Berbamine, a novel nuclear factor kappaB inhibitor, inhibits growth and induces apoptosis in human myeloma cells. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30(12): 1659-1665

5 Pan B, Zhou Y, Qi J, et al. Effect of calmodulin antagonist EBB on invasion of human fibrosarcoma cell HT1080. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2005; 27(3): 311-314

6 Duan H, Luan J, Liu Q, et al. Suppression of human lung cancer cell growth and migration by berbamine. *Cytotechnology* 2010; 62(4): 341-348

7 Wang GY, Lv QH, Dong Q, et al. Berbamine induces Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and inhibits its tumor growth in nude mice. *J Asian Nat Prod Res* 2009; 11(3): 219-228

8 Wang GY, Zhang JW, Lu QH, et al. Berbamine induces apoptosis in human hepatoma cell line SMMC7721 by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 8(4): 248-255

9 Liang Y, Zhao XY, Wei YL, et al. Berbamine induces apoptosis of multiple myeloma RPMI 8226 cells by activating GADD45/JNK pathway. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2009; 38(5): 439-444

10 Wei YL, Xu L, Liang Y, et al. Berbamine exhibits potent antitumor effects on imatinib-resistant CML cells *in vitro* and *in vivo*. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30(4): 451-457

11 何浩, 孙旭光, 张家萍, 等. 小檗胺滴眼剂防治糖尿病性白内障的研究. *北京医科大学学报* 1997; 29(4): 326-328