

丹参酮 II A 对抑制翼状胬肉成纤维细胞增殖的研究

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,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:2011-03-08 修回日期:2011-05-03

Investigation of prevention effect of tanshinone II A on human pterygium fibroblasts

Yuan Gao, Xu-Kang Cheng, Dan Chen

Department of Ophthalmology, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Yuan Gao. Department of Ophthalmology, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China. gao0477@ hotmail. com

Received: 2011-03-08 Accepted: 2011-05-03

Abstract

• AIM: To investigate the effect of tanshinone II A 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 0-320mg/L tanshinone II A for 24-96 hours. The MTT method was used to assay the biologic activities of the tanshinone II A in different time and different doses. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in each group was detected by immunohistochemical staining. The cell cycle distribution was measured by flow cytometric analysis.

• RESULTS: Administration of 80mg/L tanshinone II A for 48 hours could significantly inhibit HPF proliferation in a dose-and time-dependent manner ($P < 0.05$). Tanshinone II A (80-320mg/L) could inhibit the expression of PCNA in HPF in a dose-dependent manner ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Tanshinone II A can significantly inhibit HPF proliferation and induce its apoptosis.

• KEYWORDS: tanshinone II A; pterygium; human pterygium fibroblasts; proliferation inhibition

Gao Y, Cheng XK, Chen D. Investigation of prevention effect of tanshinone II A on human pterygium fibroblasts. *Gujia Yanke Zazhi* (Int J Ophthalmol) 2011;11(6):981-982

摘要

目的:观察丹参酮 II A 对体外培养人翼状胬肉成纤维细胞(HPF)增殖和凋亡的影响,寻找辅助治疗和预防翼状胬肉复发的新途径。

方法:用 0~320mg/L 丹参酮 II A 作用体外培养的 HPF,24~

96h 后 MTT 法检测药物对 HPF 的影响,免疫组织化学染色增生细胞核抗原(PCNA)检测细胞生长活性。

结果:80mg/L 丹参酮 II A 作用 48h 后能显著抑制 HPF 的增殖($P < 0.05$),呈剂量和时间依赖性。丹参酮 II A 在 80~320mg/L 范围内能浓度依赖性地抑制细胞表达 PCNA($P < 0.05$)。

结论:丹参酮 II A 可显著抑制 HPF 的增殖。

关键词:丹参酮 II A;翼状胬肉;成纤维细胞;增殖抑制

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 06. 014

高媛,程旭康,陈丹. 丹参酮 II A 对抑制翼状胬肉成纤维细胞增殖的研究. 国际眼科杂志 2011;11(6):981-982

0 引言

翼状胬肉是眼科的常见病,多发病。目前对于该病的发病因素还不清楚。治疗翼状胬肉的手术方法很多,但均不能很有效地降低其复发率。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。丹参酮 II A (tanshinone II A, TSN) 是我国传统中药丹参的脂溶性活性成分,具有天然的抗氧化作用。本实验探讨丹参酮 II A 对体外培养的人翼状胬肉成纤维细胞的抑制作用,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。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM 培养基、新生牛血清、胰酶为 Gibco 公司产品。丹参酮 II A 系由中国药物制品检定所提供的化学标准品,DMSO 和 MTT 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 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 为武汉博士德公司产品。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)。新鲜翼状胬肉组织来自于武汉市第一医院手术室。

1.2 方法

1.2.1 体外细胞培养 利用组织块培养法采用含 200mL/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 继续传代培养,取第 3 代或第 4 代细胞用于实验。制备细胞爬片,SP 法染色进行鉴定。

1.2.2 丹参酮 II A 对 HPF 增殖的影响 将消化好的第 4 代 HPF 按 4×10^4 /mL 转移到 96 孔板内,共设 6 组,每组设复孔 4 孔,培养 24h 待细胞贴壁后加药。丹参酮 II A 设阴性对照组 40, 80, 160 和 320mg/L,另一组为空白对照用于调零。分别继续培养 24, 48, 72 和 96h。吸去上清,各孔加 MTT 20 μ L,孵育 4h,加 120 μ L DMSO,振荡后用酶标仪测 490nm 处吸光度值 (A)。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 $\times 100\%$ 。

表1 丹参酮II A对HPF增殖的影响

TSN 浓度 (mg/L)	A 值				抑制率(%)			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
0	0.433 ± 0.003	0.382 ± 0.011	0.337 ± 0.009	0.276 ± 0.005	-	-	-	-
40	0.414 ± 0.007	0.350 ± 0.004	0.329 ± 0.012 ^a	0.206 ± 0.004 ^a	4.3	8.3	20.1	25.4
80	0.399 ± 0.005	0.286 ± 0.015 ^{a,c}	0.191 ± 0.007 ^{a,c}	0.136 ± 0.021 ^{a,c}	9.2	25.1	43.2	50.6
160	0.331 ± 0.013 ^{a,e}	0.258 ± 0.013 ^{a,e}	0.133 ± 0.005 ^{a,e}	0.087 ± 0.016 ^{a,e}	23.6	32.4	60.5	68.4
320	0.259 ± 0.006 ^{a,g}	0.162 ± 0.003 ^{a,g}	0.102 ± 0.009 ^{a,g}	0.077 ± 0.009 ^{a,g}	40.3	57.5	69.7	72.1

^aP < 0.05 vs 0mg/L 组; ^cP < 0.05 vs 40mg/L 组; ^eP < 0.05 vs 80mg/L 组; ^gP < 0.05 vs 160mg/L 组。

表2 不同浓度丹参酮II A对HPF表达PCNA的影响

TSN 浓度 (mg/L)	PCNA 表达细胞数		标记指数(%)
	-	+	
0	12	88	88
40	18	82	82
80	28	72	72 ^{a,c}
160	42	58	58 ^{a,e}
320	66	34	34 ^{a,g}

^aP < 0.05 vs 0mg/L 组; ^cP < 0.05 vs 40mg/L 组; ^eP < 0.05 vs 80mg/L 组; ^gP < 0.05 vs 160mg/L 组。

1.2.3 丹参酮II A对PCNA表达的影响 做6孔板细胞爬片后用40,80,160和320mg/L的丹参酮II A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(放大倍数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:本实验数据计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。不同浓度、不同时间丹参酮II A对细胞作用结果与对照组的差异用SPSS 11.5软件进行t检验,细胞PCNA阳性表达数采用卡方检验。取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 翼状胬肉成纤维细胞免疫组织化学鉴定 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,位于胞浆,呈现与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 丹参酮II A对HPF增殖的作用 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。40mg/L TSN作用48h后,与24h组比较有统计学差异($P < 0.05$), ≥ 80 mg/L TSN作用后,其各时间之间比较有统计学差异($P < 0.05$)。丹参酮II A 80mg/L作用48h后能显著抑制HPF的增殖,呈剂量和时间依赖性(表1)。

2.3 丹参酮II A对HPF表达PCNA的作用 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、胞浆呈淡黄色者为阴性。丹参酮II A浓度 ≥ 80 mg/L即能浓度依赖性地抑制HPF表达PCNA($P < 0.05$,表2)。

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。其不仅直接影响美观,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,且不同程度地影响眼球运动。目前临床治疗多以手术切除为主,但术后复发率较高。病理学研究表明,翼状胬肉的主要成份是异常增生的成纤维细

胞和新生血管^[1],具有类似肿瘤发生前的性质。抗代谢药物,如5-氟尿嘧啶、丝裂霉素等被认为能显著抑制眼部成纤维细胞的增殖,因此目前被广泛应用于临床,但是这类药物毒副作用大,有时会引起比较严重的并发症。多年来临床研究一直致力于寻找能有效抑制成纤维细胞增殖并且毒副作用小的药物。

中医学认为,丹参具有活血通经、祛瘀止痛等功用。丹参酮II A是丹参提取物,具有抗动脉粥样硬化、缩小心肌梗塞面积、降低心肌耗氧量,对血栓形成以及血小板聚集功能有抑制作用,近年来被广泛应用于临床,治疗心血管疾病及白血病。近年研究表明,丹参酮II A对多种肿瘤细胞具有杀伤作用,以及诱导分化和凋亡等作用^[2-5]。刘敏等^[6]研究发现,丹参酮II A对体外培养的成纤维细胞增殖和胶原合成有抑制作用。本实验研究结果表明,丹参酮II A能显著抑制翼状胬肉成纤维细胞的增殖。目前认为,成纤维细胞增殖及分化主要与TGF- β 信号通路的过度活化有关^[7]。邹昌群等^[8]通过观察丹参酮II A对大鼠心脏成纤维细胞内TGF- $\beta 1$ 信号转导的作用,发现丹参酮II A可阻止TGF- $\beta 1$ 诱导的Smad2/3磷酸化,干扰成纤维细胞内TGF- $\beta 1$ /Smads信号通路,抑制细胞外基质的合成与分泌,从而抑制成纤维细胞的增殖。

本实验结果表明,丹参酮II A能呈时间、剂量依赖性抑制翼状胬肉成纤维细胞的增殖和诱导凋亡,提示丹参酮II A在治疗翼状胬肉方面有应用前景,为治疗翼状胬肉提供了新的思路。但目前研究仅限于离体实验,且丹参酮II A发挥作用机制较为复杂,在不同的细胞类型中表现出不同的效应,诱导效应产生的分子机制也不尽相同,尚未系统、明确地了解,有待进一步研究。

参考文献

- 1 Corone MT, Di Girolamo N, Wakefield D. The pathogenesis of pterygia. *Curr Opin Ophthalmol* 1999;10(2):282-288
- 2 杨艺,邓长生.丹参酮药理作用近识.湖北中医杂志 1999;21(6):284-286
- 3 梁勇,羊裔明,袁淑兰.丹参酮药理作用及临床应用研究进展.中草药 2000;31(4):304-306
- 4 Lee DS, Lee SH, Kwon GS, et al. Inhibition of DNA Topoisomerase I by Dihydroshanshione I, component of a medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63(8):1370-1373
- 5 张玉五,高亚菲.活血化痰药丹参抗肿瘤作用研究进展.西安医科大学学报 1990;11(20):191-192
- 6 刘敏,彭明煜,刘铭,等.胰岛素及丹参对体外培养成纤维细胞影响的实验研究.中国修复重建外科杂志 1998;12(1):52-54
- 7 Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2007;4(2):184-195
- 8 邹昌群,占成业,白祥军.丹参酮II A抗心肌纤维化作用机制实验研究.内科急危重症杂志 2008;14(5):242-245