

# 乙酰肝素酶抑制剂对体外培养视网膜色素上皮细胞增殖的影响

唐维强, 张岩, 李晓艳

作者单位: (100048) 中国北京市, 解放军总医院第一附属医院眼科

作者简介: 唐维强, 博士后, 副主任医师, 研究方向: 眼肿瘤、黄斑变性。

通讯作者: 唐维强. weiqiangtang2005@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-05-15 修回日期: 2012-06-28

## Effect of heparanase inhibitor on proliferation of retinal pigment epithelial cell

Wei-Qiang Tang, Yan Zhang, Xiao-Yan Li

Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Correspondence to: Wei-Qiang Tang. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China. weiqiangtang2005@yahoo.com.cn

Received: 2012-05-15 Accepted: 2012-06-28

### Abstract

• AIM: To investigate the effect of heparanase (HPA-1) inhibitor on the proliferation of human retinal pigment epithelial (RPE) cell.

• METHODS: Hunan RPE cells were primarily cultured and the fifth generation cells were used in the experiment. The phosphomannopentaose sulfate (PI-88) solutions of different concentrations were added into the medium for 48 and 72 hours to co-culture the cells. The proliferation of human RPE cell was estimated using MTT colorimetric assay as the  $A_{570}$  value. The expression of keratin and HPA-1 in the cells was detected by immunocytochemistry.

• RESULTS: HPA-1 was intently expressed in both the cytoplasm and nucleus of human RPE cells, and weak expression was seen in RPE cells co-cultured with PI-88. Either in 48 hours or 72 hours, the  $A_{570}$  values of various concentrations of PI-88 culture group were significantly declined in comparison with without PI-88. When PI-88 was administered for 72 hours, the  $A_{570}$  values showed the tendency of reduction to those of 48 hours in >100mg/L groups.

• CONCLUSION: HPA-1 inhibitor can suppress the proliferation of human RPE cell at the concentration- and time-dependent manner *in vitro*.

• KEYWORDS: phosphomannopentaose sulfate; heparanase; retinal pigment epithelial cell

Citation: Tang WQ, Zhang Y, Li XY. Effect of heparanase inhibitor on proliferation of retinal pigment epithelial cell. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(8):1463-1466

### 摘要

目的: 探讨乙酰肝素酶 (heparanase-1, HPA-1) 抑制剂应用对体外培养的视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞增殖的影响。

方法: 采用 DMEM 培养基 (Dulbecco's modified eagles medium, DMEM) 体外培养人 RPE 细胞, 选择第 5 代细胞用于实验。倒置显微镜下直接观察不同质量浓度硫代磷酸甘露醇戊糖 (phosphomannopentaose sulfate, PI-88) 对人 RPE 细胞体外生长的干预效果, 应用四甲基偶氮唑盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT] 比色法检测 RPE 细胞  $A_{570}$  值; 免疫组织化学方法检测人 RPE 细胞角蛋白和 HPA-1 表达。

结果: 体外增生的 RPE 细胞胞浆和细胞核 HPA-1 呈强阳性表达, 以细胞浆内表达为主, PI-88 干预后细胞浆表达减弱。PI-88 对体外 RPE 细胞的增生有明显的时效和量效抑制关系, 药物干预 72h 细胞  $A_{570}$  值随质量浓度不同表现明显下降趋势 ( $P < 0.05$ ); 而同一质量浓度, 药物质量浓度达到 100mg/L 及以上时, 48 ~ 72h 才表现  $A_{570}$  值减小的趋势。

结论: HPA-1 抑制剂可抑制体外培养 RPE 细胞的增生, 并呈现剂量和时间依赖关系。

关键词: 硫代磷酸甘露醇戊糖; 乙酰肝素酶; 视网膜色素上皮

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.08.10

引用: 唐维强, 张岩, 李晓艳. 乙酰肝素酶抑制剂对体外培养视网膜色素上皮细胞增殖的影响. 国际眼科杂志 2012; 12(8): 1463-1466

### 0 引言

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 是视网膜感光细胞层和脉络膜血管层之间的单细胞层, 当局部脉络膜血流灌注发生障碍, RPE 细胞可通过自分泌或旁分泌方式生成各种血管生长刺激因子<sup>[1,2]</sup>。Lassota 等<sup>[3]</sup>通过机械损伤猪 Bruch's 膜诱导脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV), 结果发现保留 RPE 细胞层较刮除 RPE 细胞层诱导出的 CNV 膜血管化程度要高得多。我们之前的研究则表明, 乙酰肝素酶 (heparanase-1, HPA-1) 在实验性 CNV 表达上调, 其抑制剂的应用可使 CNV 的发

生、发展受到明显抑制<sup>[4]</sup>。为探讨 RPE 细胞增生与 HPA-1 表达的相关性,本实验采用免疫组织化学 SP 法检测了体外培养 RPE 细胞增殖过程 HPA-1 的表达情况,并应用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法观察 HPA-1 抑制剂——硫代磷酸甘露醇戊糖(phosphomannopentaose sulfate,PI-88)对 RPE 细胞增殖的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞与试剂** 人 RPE 细胞由解放军 309 医院惠赠,采用广谱鼠抗人角蛋白抗体进行免疫组织化学方法进行鉴定。鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体(克隆号:AE1/AE3,福州迈新生物技术开发公司),兔抗鼠(人)HPA-1 多克隆抗体(美国 Santa-Cruz 公司),山羊抗兔及山羊抗小鼠 SP 试剂盒、枸橼酸盐缓冲液(北京中杉金桥生物技术有限公司),AEC 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发公司),DMEM 培养液、四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国 Sigma 公司),PI-88 粉剂(澳大利亚 Progen 公司,先配制成 1 000mg/L 母液,超净工作台内微孔滤膜正压抽滤除菌,然后根据 PI-88 质量浓度要求以含 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液梯度稀释)。

**1.1.2 主要仪器设备** 超净工作台(北京半导体设备一厂),5410 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(美国 Napco 公司),BX-50 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),318 型酶联免疫检测仪(上海三科科学仪器公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 RPE 细胞培养及鉴定** 从液氮中取出第 3 代 RPE 细胞冻存管,迅速置入 37℃ 水浴中使其完全融化,用吸管吸入 15mL 离心管中,加入约 5mL DMEM 培养液 1000r/min 离心 5min,弃去上清液,再次用培养液洗涤 1000r/min 离心 5min 后弃上清液,加入适量含 100mL/L 胎牛血清培养液重悬后 1:2 接种于 25cm<sup>2</sup> 培养瓶中,50mL/L CO<sub>2</sub>,37℃ 静置培养。每 2d 更换 1 次培养液,细胞近铺满时,以 2.5g/L 胰蛋白酶消化传代,选择第 5 代细胞用于实验。RPE 细胞鉴定(免疫组织化学 SP 法):培养瓶接种细胞前,从瓶口置入预先裁剪消毒的盖玻片 2~3 块,传代时取出并于 950mL/L 乙醇固定 30min,PBS 漂洗后滴加 7.5mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS 液 37℃ 孵育 30min 以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水冲洗后 PBS 洗 2min×3 次,滴加山羊封闭血清,湿盒内 37℃ 放置 30min,倾去,直接滴加鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体(1:50 稀释,37℃ 湿盒内 45min),PBS 漂洗 2min×3 次,滴加山羊抗小鼠 IgG 抗体置 37℃ 湿盒内 20min,PBS 漂洗 2min×3 次,滴加 SP 试剂 37℃ 湿盒内 20min,PBS 漂洗后 AEC 显色,苏木素衬染,水溶性封片剂封片。阴性对照片,一抗以 PBS 代替,其余步骤完全相同。

**1.2.2 细胞爬片的制备和观察** 将处于对数生长期的细胞消化后,接种于预置有盖玻片的 6 孔培养板中(每孔 1~2 块预先裁减合适大小盖玻片),每孔接种 10<sup>5</sup> 个细胞,接种 24h 后更换培养液,每孔加入 2mL 新配制的含 100mL/L 胎牛血清 DMEM 培养液,调配 PI-88 剂量使 6 孔中 PI-88 质量终浓度为 0mg/L×3 孔(对照)、25mg/L×3

孔,继续培养 72h 取出爬片,直接在倒置显微镜下选择各爬片的最大细胞密度视野进行观察、拍照、进行免疫组织化学染色。

**1.2.3 HPA-1 免疫组织化学染色** 细胞爬片在 950mL/L 乙醇中固定 30min 后 PBS 漂洗,滴加 7.5mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS 液 37℃ 孵育 30min,PBS 洗 2min×3 次,滴加 50mL/L 牛血清白蛋白封闭液湿盒内 37℃ 放置 30min,倾去多余液体。滴加兔抗鼠(人)HPA-1 多克隆抗体(1:70,37℃ 湿盒,1h),PBS 漂洗 2min×3 次。滴加山羊抗兔 IgG 抗体,置 37℃ 湿盒内孵育 20min,PBS 漂洗 2min×3 次。滴加 SP 试剂,37℃ 湿盒内孵育 20min,PBS 漂洗 2min×3 次。新鲜配制 AEC 试剂工作液,室温下显色,光学显微镜下控制反应时间,流水洗涤。苏木素复染,水溶性封片剂封片。PBS 取代一抗孵育,作为阴性对照。

**1.2.4 MTT 比色法检测 PI-88 对 RPE 细胞增生的作用** 取对数生长期的细胞,用 2.5g/L 胰蛋白酶消化,以每孔 5×10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔体积 200μL。常规培养 24h 后,更换培养液,根据分组,含 100mL/L 胎牛血清 DMEM 培养液中 PI-88 的终浓度分别调整为 0(对照),5,10,15,25,50,75,100,250,500mg/L,每组重复设 4 个孔继续培养 48,72h(2 个时间点各重复种植 3 块培养板,每组计算 12 个孔结果)。每孔加入 MTT 溶液(5mg/mL)20μL,4h 后小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入二甲基亚砷 150μL,多功能涡旋器振荡 10min 左右,使紫色结晶充分溶解,置酶联免疫检测仪上选择 570nm 波长测定各孔光吸收值(A<sub>570</sub>值)以间接反映活细胞数量和细胞增殖状况。以 A<sub>570</sub> 值为纵轴,PI-88(mg/L)质量浓度为横轴,绘制 2 个时间点 10 个不同 PI-88 终质量浓度干预下细胞生长状态曲线。

统计学分析:各组 MTT 数据结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用 SPSS 11.0 统计学软件对结果进行统计分析。采用单因素方差分析比较不同时间点和不同 PI-88 浓度组间差异。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞形态学观察及免疫组织化学染色** 本实验采用含 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基培养人 RPE 细胞,正常培养的 RPE 细胞呈铺路石样排列生长,单个细胞形态呈梭形、多角形形态,细胞两端伪足细长(图 1)。采用免疫组织化学 SP 法,经过广谱细胞角蛋白抗体(AE1/AE3)鉴定,结果表明角蛋白在细胞浆内弥漫性特异表达,证实培养细胞为上皮性细胞;HPA-1 抗体染色结果:RPE 细胞浆和细胞核 HPA-1 均有表达,以细胞浆内表达为主,25mg/L PI-88 干预培养的 RPE 细胞胞浆内 HPA-1 弱阳性表达(图 2)。倒置显微镜下观察 PI-88 干预 RPE 细胞增殖过程 72h 后细胞的生长状态(图 3)。

**2.2 PI-88 对 RPE 细胞增生的作用** 对照组及 PI-88 质量浓度分别为 15,25,50,75,100,250,500mg/L 对 RPE 细胞生长干扰 48 和 72h 后结果表明,随时间变化,48~72h 时 75mg/L 以下浓度的 PI-88 对细胞生长的抑制效应小于细胞自身的增殖效应,细胞 A<sub>570</sub> 值增大,当质量浓度增至 100mg/L 以上 A<sub>570</sub> 值表现减小趋势(图 4)。与对照组



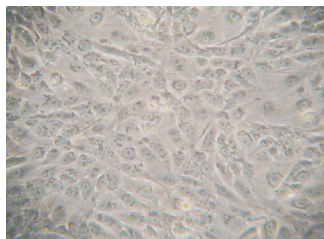


图1 倒置显微镜下 RPE 细胞形态观察 ( $\times 200$ )。

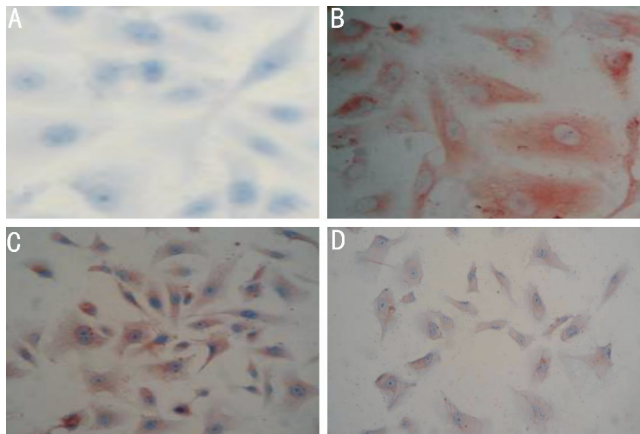


图2 RPE 细胞免疫组织化学染色 A:阴性对照组 ( $\times 400$ ); B:培养的第5代人 RPE 细胞的胞浆内角蛋白抗体强阳性表达 ( $\times 400$ ); C:无 PI-88 干预培养的 RPE 细胞浆内和少数细胞核 HPA-1 强阳性表达 ( $\times 200$ ); D:25mg/L PI-88 干预培养的 RPE 细胞胞浆内 HPA-1 弱阳性表达 ( $\times 200$ )。

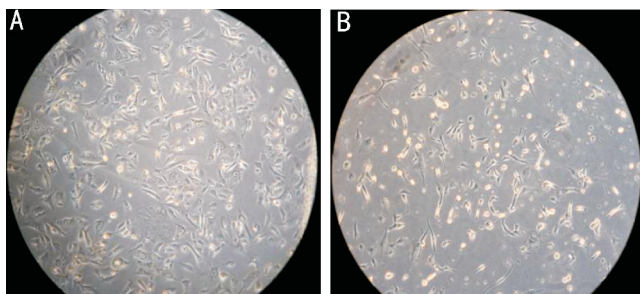


图3 PI-88 作用 72h 后 6 孔培养板 RPE 生长情况 ( $\times 100$ ) A:0mg/L PI-88; B:25mg/L PI-88。

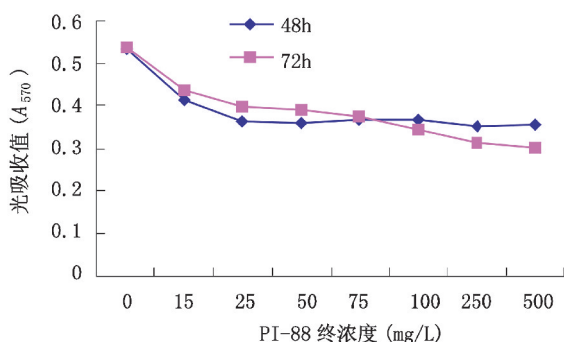


图4 不同浓度 PI-88 作用不同时间 RPE 细胞增殖状态变化图。

细胞生长比较,48h 各浓度 PI-88 干预的细胞  $A_{570}$  值减少均非常显著 ( $F = 22.8668, P < 0.01$ ), 质量浓度增至 25mg/L 浓度即达到最大的抑制效应,量效关系不明显(图 4);72h 可见 PI-88 抑制细胞增殖呈现明显的量效关系 ( $F = 32.9326, P < 0.01$ ), 随 PI-88 浓度的增加,细胞  $A_{570}$  值持续降低,PI-88 浓度为 500mg/L 达到最大的抑制效应(表 1)。

表1 PI-88 对人 RPE 细胞作用 48h 和 72h 时  $A_{570}$  值变化

PI-88 浓度 (mg/L)	$\bar{x} \pm s$	
	48h	72h
0	0.533 ± 0.028	0.536 ± 0.037
15	0.412 ± 0.017 <sup>b</sup>	0.437 ± 0.045 <sup>d</sup>
25	0.364 ± 0.035 <sup>b</sup>	0.398 ± 0.038 <sup>a,d</sup>
50	0.357 ± 0.049 <sup>b</sup>	0.390 ± 0.062 <sup>a,c,d</sup>
75	0.367 ± 0.064 <sup>b</sup>	0.374 ± 0.044 <sup>d</sup>
100	0.365 ± 0.054 <sup>b</sup>	0.345 ± 0.045 <sup>d</sup>
250	0.352 ± 0.037 <sup>b</sup>	0.314 ± 0.036 <sup>d</sup>
500	0.355 ± 0.053 <sup>b</sup>	0.301 ± 0.056 <sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 72h 15mg/L 组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 48h 0mg/L 组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 72h 100mg/L 组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 72h 0mg/L 组。

### 3 讨论

RPE 是与视网膜光感细胞层紧密相连的单细胞层,维持着正常视网膜功能并形成外层血-视网膜屏障,正常情况下大多数 RPE 细胞处于静止状态,而视网膜脱离、眼底激光光凝、手术损伤等均可导致 RPE 细胞的增殖和迁移过程<sup>[5]</sup>。RPE 细胞的增殖过程涉及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解,基底膜与 ECM 主要由两种成分构成:一是蛋白水解酶底物——结构蛋白,包括胶原、层粘连蛋白、纤维结合素等;二是糖氨基聚糖,其主要成分是硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG)。研究已证实在老年黄斑变性、增殖性玻璃体视网膜病变等 RPE 功能紊乱性疾病中, RPE 细胞层的蛋白水解酶——基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 活性明显增高<sup>[6,7]</sup>,而 HPA-1 是哺乳动物体内唯一的内切糖苷酶, HSPG 是其主要作用底物,这种酶解作用同样直接影响机体伤口愈合、血管发生、炎症和肿瘤转移等多种重要的生理和病理过程<sup>[8,9]</sup>。为探讨体外培养的人 RPE 细胞增生过程与 HPA-1 的相关性,本实验采用免疫组织化学 SP 法研究 HPA-1 蛋白在 RPE 细胞的表达,并采用 MTT 检测 HPA-1 特异性抑制剂 PI-88 对人 RPE 细胞体外增生过程的影响。

本实验的 MTT 结果表明,梯度质量浓度的 PI-88 对 RPE 细胞增生过程呈现明显的量-效和时-效抑制作用。干预 48h, 25mg/L 质量浓度即达到最大的抑制效应, 50, 75, 100, 250, 500mg/L 质量浓度下的细胞  $A_{570}$  值并无明显差异;干预 72h 则出现明显的量效依赖关系,细胞  $A_{570}$  值持续下降, 500mg/L 达到最大抑制效应。显然, HPA-1 特异性抑制剂 PI-88 可明显抑制人 RPE 细胞体外增生过程。PI-88 目前已被应用于抗癌治疗的临床试验,研究表明其不仅可直接抑制该 HPA-1 的酶解活性,还有封闭 ECM 中肝素侧链结合的多种生长因子 (VEGF, bFGF 等) 的作用<sup>[10,11]</sup>。免疫组织化学结果发现,正常体外培养的人 RPE 细胞浆和细胞核内 HPA-1 呈强阳性表达, PI-88 干预后 HPA-1 在 RPE 细胞浆为弱阳性表达,对应于倒置显微镜下后者细胞生长密度明显稀疏,表明 HPA-1 对 RPE 细胞的增生过程可能起着促进作用,抑制该酶活性可使细胞增生受到抑制。

总之,本实验通过 HPA-1 抑制剂对体外培养的 RPE 细胞增生过程进行干预,并观察增生过程的 RPE 细胞表达该酶蛋白及干预后的变化,初步表明 RPE 细胞增殖、迁移过程与 HPA-1 表达相关。

致谢:感谢解放军 309 医院司艳芳博士惠赠人 RPE 细胞,澳大利亚 CANBERR 医院梁晓明博士惠赠 Progen 公司生产 PI-88 粉剂。

#### 参考文献

- 1 Chin MS, Nagineni CN, Hooper LC, *et al.* Cyclooxygenase-2 gene expression and regulation in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(10):2338-2346
- 2 Li GY, Fan B, Wu YZ, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor gene expression by T7-siRNAs in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Chinese Medical J* 2005;118(7):567-573
- 3 Lassota N, Kiilgaard JF, Prause JU, *et al.* Surgical induction of choroidal neovascularization in a porcine model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245(8):1189-1198
- 4 唐维强,何守志,梁晓明,等. 硫代磷酸甘露醇戊糖防治实验性脉络膜新生血管的初步研究. *中华眼科杂志* 2008;44(9):813-819
- 5 Wang SZ, Ma W, Yan RT, *et al.* Generating retinal neurons by

reprogramming retinal pigment epithelial cells. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10(8):1227-1239

6 Elliot S, Catanuto P, Fernandez P, *et al.* Subtype specific estrogen receptor action protects against changes in MMP-2 activation in mouse retinal pigmented epithelial cells. *Exp Eye Res* 2008;86(4):653-660

7 Hou X, Han QH, Hu D, *et al.* Mechanical force enhances MMP-2 activation via p38 signaling pathway in human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247(11):1477-1486

8 Li J, Li JP, Zhang X, *et al.* Expression of heparanase in vascular cells and astrocytes of the mouse brain after focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2012;1433(1):137-144

9 Arvat G, Shafat I, Levy-Adam F, *et al.* The heparanase system and tumor metastasis: is heparanase the seed and soil? *Cancer Metastasis Rev* 2011;30(2):253-268

10 Khasraw M, Pavlakis N, McCowatt S, *et al.* Multicentre phase I/II study of PI-88, a heparanase inhibitor in combination with docetaxel in patients with metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* 2010;21(6):1302-1307

11 唐维强,李晓艳. 乙酰肝素酶抑制剂对人脐静脉内皮细胞增生和乙酰肝素酶表达的影响. *中华实验眼科杂志* 2011;29(6):1097-1101