

Avastin 与 Lucentis 对 HUVEC 增殖和迁移的抑制作用研究

金鑫, 陈兵, 刘铁城, 张卯年

作者单位: (100853) 中国北京市, 解放军总医院眼科
作者简介: 金鑫, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 眼底病、眼科遗传病。

通讯作者: 张卯年, 主任医师, 教授, 研究方向: 眼底病. zmn301@sina.com

收稿日期: 2013-01-21 修回日期: 2013-05-23

Comparative study of inhibition effects of Avastin and Lucentis on human umbilical vein endothelial cell proliferation and migration

Xin Jin, Bing Chen, Tie-Cheng Liu, Mao-Nian Zhang

Department of Ophthalmology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Mao-Nian Zhang. Department of Ophthalmology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. zmn301@sina.com

Received: 2013-01-21 Accepted: 2013-05-23

Abstract

• AIM: To investigate the effects of Avastin and Lucentis on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) proliferation and migration and study the ways of them inhibiting neovessels.

• METHODS: MTT was used to assay the different effects on proliferation of HUVEC between the same concentration of Avastin and Lucentis; Transwell was used to measure the different effects on inhibition of HUVEC between the same concentration of Avastin and Lucentis.

• RESULTS: MTT showed that A value was significantly different in the respective concentration Avastin groups, Lucentis groups and control group ($P < 0.05$), and there was no significant difference between the same concentration Avastin groups and the Lucentis groups. Transwell analysis showed that the rate of HUVEC migration was significantly different in the respective concentration Avastin groups, Lucentis groups and control group ($P < 0.05$), and there was no significant difference between the same concentration Avastin groups and the Lucentis groups.

• CONCLUSION: Avastin and Lucentis could inhibit HUVEC proliferation and migration and inhibition effects of Avastin and Lucentis on HUVEC proliferation and migration enhancement enhanced with the increasing of the drug concentration. There was no significant

difference in inhibition effects on proliferation and migration of HUVEC between the same concentration of Avastin and Lucentis *in vitro*.

• KEYWORDS: Avastin; Lucentis; HUVEC; proliferation; migration; neovessels

Citation: Jin X, Chen B, Liu TC, *et al*. Comparative study of inhibition effects of Avastin and Lucentis on human umbilical vein endothelial cell proliferation and migration. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(6):1096-1098

摘要

目的: 探讨 Avastin 与 Lucentis 对人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 增殖和迁移的影响, 了解其抑制血管生成的途径。

方法: 采用 MTT 比色法研究相同浓度 Avastin 与 Lucentis 对 HUVEC 增殖作用的差异; Transwell 小室检测相同浓度 Avastin 与 Lucentis 对 HUVEC 迁移作用的差异。

结果: MTT 比色法显示, 各浓度 Avastin 组、Lucentis 组与对照组相比, 吸光度值具有统计学差异 ($P < 0.05$), 相同浓度 Avastin 组与 Lucentis 组吸光度值无统计学差异 ($P > 0.05$); Transwell 分析方法显示, 各浓度 Avastin 组、Lucentis 组与对照组相比, HUVEC 迁移率具有统计学差异 ($P < 0.05$), 相同浓度 Avastin 组与 Lucentis 组 HUVEC 细胞迁移率无统计学差异 ($P > 0.05$)。

结论: Avastin 与 Lucentis 均可以抑制 HUVEC 增殖和迁移; 随着药物浓度增加, 对 HUVEC 增殖和迁移的抑制作用增强; 相同浓度 Avastin 与 Lucentis 在体外实验中对 HUVEC 增殖和迁移的抑制作用无统计学差异 ($P > 0.05$)。

关键词: Avastin; Lucentis; 人脐静脉血管内皮细胞; 增殖; 迁移; 新生血管

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.09

引用: 金鑫, 陈兵, 刘铁城, 等. Avastin 与 Lucentis 对 HUVEC 增殖和迁移的抑制作用研究. 国际眼科杂志 2013;13(6):1096-1098

0 引言

血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 是眼内新生血管形成的主要刺激因子, 在 CNV 和黄斑水肿的发病中起重要作用。玻璃体内或前房内注射 VEGF 抑制剂对各种原因引起的黄斑水肿和眼内新生血管性疾病均有较好的疗效。Avastin (药品名 Bevacizumab) 和 Lucentis (药品名 Ranibizumab) 是目前在临床中广泛使用的两种 VEGF 抑制剂, 其中 Lucentis 已被美国食品及药品管理局批准用于眼科临床, 两者均具有显著的抗新生血管形成及降低血管通

透性的作用。本研究对比了相同浓度的两种药物对人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)增殖和迁移的抑制作用,探讨两种药物对血管生成抑制作用的差异。

1 材料和方法

1.1 材料 人脐静脉内皮原代细胞株(HUVEC, Ca. t No. 8000, Lo. t No. 0182)及ECM培养基(Endothelial cellmedium)(均为美国Sciencell公司),ECM培养基(含各种必须和非必须氨基酸、维生素、有机和无机化合物、激素、生长因子、微量矿物质、50mL/L胎牛血清、1%青霉素/链霉素)。MTT(美国Gibco公司)。Dimethyl sulfoxide(DMSO, 美国Sigma公司),胰蛋白酶和己二胺四乙酸(上海生物制品公司),3422Transwell(美国Corning-Constar公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测相同浓度Avastin与Lucentis对HUVEC细胞增殖的影响 将处于对数生长期的HUVEC制成细胞悬液,在96孔板每孔接种 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ HUVEC,当细胞8h贴壁生长后,分别换为含不同浓度Avastin和Lucentis(0.01,0.1,1mg/mL)的培养液,以PBS作为阴性对照,每组同时设6个复孔。再培养24h,然后加MTT(5g/L)20 μ L/孔,继续培养4h,弃上清,加二甲基亚砷150 μ L/孔,振荡器振荡10min,使紫色结晶充分溶解,置酶联免疫检测仪上测定波长570nm下的吸光度A值。

1.2.2 Transwell小室检测相同浓度Avastin与Lucentis对HUVEC细胞迁移的影响 24孔板的细胞培养孔中加入Tranwell小室,将无血清饥饿培养36h的HUVEC悬液100 μ L(1×10^5 个细胞)加入上层小室,每组分别加入0.01,0.1,1mg/mL浓度Avastin和Lucentis,培养30min,下层小室均加入200 μ L的ECM培养基,内含100mL/L FBS,37 $^{\circ}$ C下50mL/L CO₂ 孵育箱中培养8h,取出上层小室,用棉签拭去小室内的细胞,4%聚甲醛固定,苏木素染色,显微镜下观察微孔滤膜侧面上的细胞(每组6个样本)。每个样本随机择6个高倍镜视野($\times 300$)进行细胞计数,取平均值表示。

统计学分析:应用SPSS 12.0统计分析软件进行数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多因素方差分析方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Avastin与Lucentis对HUVEC增殖的影响 研究中将3种不同浓度(1,0.1,0.01mg/mL)的Avastin和Lucentis与HUVEC共孵育24h,进行MTT比色实验,对照组细胞生长明显,而各浓度Avastin组与Lucentis组细胞生长明显抑制,各浓度Avastin组、Lucentis组A值具有显著统计学差异($P < 0.01$),相同浓度Avastin组与Lucentis组间A值无统计学差异($P > 0.05$,表1),提示Avastin与Lucentis均可以抑制HUVEC增殖,随着药物浓度的增加,对HUVEC细胞增殖抑制作用增加,但相同浓度Avastin与Lucentis对HUVEC增殖的抑制作用无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 Avastin与Lucentis对HUVEC迁移的影响 研究应用Transwell分析方法,用含有100mL/L FBS的ECM培养基作为趋化剂,刺激HUVEC细胞迁移,与3种不同浓度

表1 Avastin与Lucentis对HUVEC增殖和迁移的影响 $\bar{x} \pm s$

药物浓度 (mg/mL)	分组	A值	穿膜细胞数 (个)
0	PBS	0.83 \pm 0.019	131.76 \pm 7.32
0.01	Avastin	0.78 \pm 0.015	113.46 \pm 9.51
	Lucentis	0.77 \pm 0.012	109.71 \pm 10.12
0.1	Avastin	0.64 \pm 0.017	55.17 \pm 6.49
	Lucentis	0.65 \pm 0.014	57.02 \pm 6.49
1	Avastin	0.43 \pm 0.018	29.83 \pm 4.74
	Lucentis	0.43 \pm 0.021	30.07 \pm 4.82

(1,0.1,0.01mg/mL)的Avastin和Lucentis培养8h后,对照组、各浓度Avastin组与Lucentis组穿膜的细胞数有显著统计学差异($P < 0.01$),相同浓度Avastin组与Lucentis组间穿膜的细胞数无统计学差异($P > 0.05$,表1),提示Avastin与Lucentis均可以抑制HUVEC细胞迁移,随着药物浓度增加,HUVEC迁移率下降,但相同浓度Avastin与Lucentis对HUVEC细胞迁移的抑制作用无统计学差异($P > 0.05$)。

3 讨论

眼内新生血管性疾病是眼科常见的一类疾病,在糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、年龄相关性黄斑变性等疾病中的发生率很高,严重影响视功能预后。血管生成的过程复杂,首先血管舒张、血管通透性增加、周围基质降解,接着内皮细胞(endothelial cells, EC)活化、移行、增生、出芽生长并形成管腔,最后新生血管成熟、重塑构成血管网^[1]。多种细胞因子参与新生血管生成的调控,血管生长因子和抑制因子之间平衡的破坏是血管生成的关键素之一。其中VEGF是最重要的促新生血管因子,抗-VEGF药物的应用为眼内新生血管性疾病的治疗开辟了新的思路,玻璃体内注射各种抗-VEGF药物治疗眼内新生血管性疾病在世界范围内被广泛应用。Avastin为人源化的抗VEGF重组鼠单克隆抗体,能阻断VEGF受体所有亚型与内皮细胞表面受体Flt-1和KDR的结合,以达到抑制内皮细胞增生及新生血管形成的目的;而Lucentis主要拮抗VEGF165,VEGF121和VEGF110,阻止血管渗漏新生血管的形成,从而抑制CNV的生成^[2]。目前越来越多的研究开始关注这两种药物疗效的比较,大多数研究表明,Avastin与Lucentis在治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性时,在稳定患者视力、减少新生血管渗漏等方面均显示出相似的疗效。Shah等^[3]回顾性分析了接受玻璃体内注射抗-VEGF药物的316例患者(其中Lucentis 202例,Avastin 114例),结果显示Lucentis注射组患者的黄斑中心凹厚度由基线时278 \pm 84 μ m显著下降到治疗后227 \pm 80 μ m,黄斑水肿体积由基线时7.22 \pm 0.96mm³显著下降至治疗后6.69 \pm 0.74mm³。Avastin注射组患者黄斑中心凹厚度由基线时288 \pm 94 μ m显著下降到治疗后220 \pm 55 μ m,黄斑水肿体积由基线时7.36 \pm 1.08mm³显著下降至治疗后6.50 \pm 0.42mm³,Lucentis平均药效持续时间为74.0 \pm 19.1d,而Avastin为101.8 \pm 16.6d。Valmaggia等^[4]观察了2006-04/2008-08接受Avastin治疗的324眼及接

受 Lucentis 治疗的 348 眼, Avastin (1.25mg/0.05mL) 每 6wk 注射 1 次, Lucentis (0.05mg/0.05mL) 每 4wk 注射 1 次。完成 Avastin 注射的 319 眼在第 3.3 次注射时视力平均提高了 5.1 个 ETDRS 字母, 完成 Lucentis 注射的 226 眼在第 3.4 次注射时视力平均提高 6.4 个 ETDRS 字母。在本研究中, 两种药物体外干预 HUVEC 结果显示: Avastin 和 Lucentis 均可以抑制内皮细胞的增生和迁移, 并且随着药物浓度增大而作用增强, 与对照组相比, 两种药物的各个剂量都明显地抑制了细胞的增生和迁移, 而相同药物浓度的 Avastin 和 Lucentis 对 HUVEC 的增生和迁移抑制作用无显著性差异。此结果与其治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性的临床结果一致。提示 Avastin 与 Lucentis 的作用靶点虽然有区别, 两种药物对新生血管的抑制作用程度相似。而 Avastin 较 Lucentis 到达药效峰值的时间更

长, 在眼内疗效更久。提示 Avastin 与 Lucentis 在玻璃体腔内及视网膜组织中的弥散性以及渗透性可能存在差异, 导致药物的作用时间存在差异。

参考文献

- 1 Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, *et al.* Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22(1):1-29
- 2 庄岩, 陈有信. 抗血管内皮生长因子单克隆抗体 Bevacizumab 基础和临床研究现状. *中华眼底病杂志* 2008; 24(3):227-231
- 3 Shah AR, Del Priore LV. Duration of action of intravitreal ranibizumab and bevacizumab in exudative AMD eyes based on macular volume measurements. *Br J Ophthalmol* 2009; 93(8):1027-1032
- 4 Valmaggia C, Niederberger H, Lang C, *et al.* The treatment of choroidal neovascularisation with intravitreal injections of bevacizumab (Avastin). *Klin Monbl Augenheilkd* 2008; 225(5):380-384

热烈祝贺《国际眼科杂志》中、英文版两刊被 DOAJ 收录

本刊讯: 国际眼科杂志英文版——International Journal of Ophthalmology 和国际眼科杂志中文版——International Eye Science 分别于 2013-04-24 和 2013-05-06 率先被全球最具影响力的开放存取期刊数据库——DOAJ(directory of open access journals) 收录。

DOAJ 是目前最权威、认知度最高的开放存取期刊目录。2003-02, 在 OSI(The Open Society Institute) 支持下, 瑞典隆德大学图书馆与 SPARC(The Scholarly Publishing and Academic Resources Coalition) 联合创建了 DOAJ。DOAJ 由隆德大学图书馆负责维护, 旨在覆盖所有学科、所有语种的高质量的开放存取期刊, 以现代信息组织理论为基础, 对开放存取期刊进行组织, 提高其透明度、可用性和利用率, 为科研工作者提供一站式服务, 从而推动开放存取运动更快发展, 促进全球范围内的学术交流和研究。该目录收录的期刊均为学术性、研究性期刊, 且都经过同行评议、或者有编辑做质量控制, 具有免费、全文、自由获取、高质量等特点, 对学术研究有很高的参考价值。

(本刊编辑部)