

水蛭提取液对人视网膜母细胞瘤细胞的抑制作用

李园媛, 郑燕林, 刘晓莉, 李 晖, 王 芳, 郑 森, 张馨月, 马宏杰

引用: 李园媛, 郑燕林, 刘晓莉, 等. 水蛭提取液对人视网膜母细胞瘤细胞的抑制作用. 国际眼科杂志 2020;20(10):1693-1698

基金项目: 四川省国际科技创新合作项目 (No.2019YFH0117)

作者单位: (610000) 中国四川省成都市, 成都中医药大学附属医院眼科

作者简介: 李园媛, 博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗眼底病。

通讯作者: 郑燕林, 主任医师, 博士研究生导师, 眼科主任, 研究方向: 中西医结合治疗眼底病. zhengyanlin@cdutcm.edu.cn

收稿日期: 2020-04-25 修回日期: 2020-09-04

摘要

目的: 研究水蛭提取液对人视网膜母细胞瘤 WERI-RB-1 细胞的抑制作用。

方法: 采用不同浓度水蛭提取液 (0.02、0.04、0.08、0.16U/mL) 作用于体外培养的 WERI-RB-1 细胞 0、24、48、72h, 经 CCK-8 法筛选最佳药物干预浓度和时间进行后续实验。将体外培养的 WERI-RB-1 细胞分为对照组 (正常培养基培养) 和实验组 (含水蛭提取液培养基培养), 采用流式细胞仪检测药物对细胞周期和细胞凋亡的影响, Transwell 侵袭实验检测药物对细胞侵袭能力的影响。

结果: 根据 CCK-8 法检测结果选择 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液作用 48h 为最佳干预条件进行实验。水蛭提取液干预的细胞主要阻滞在 G2/M 期, 其中 0.04、0.08U/mL 实验组处于 G2/M 期的阳性细胞率分别为 (12.59 ± 5.36)%、(14.79 ± 4.12)%, 均明显高于对照组 [(3.00 ± 2.32)%、 $P < 0.01$]。水蛭提取液可诱导细胞凋亡, 其中 0.04、0.08U/mL 实验组细胞凋亡率分别 (37.91 ± 3.44)%、(33.05 ± 2.25)%, 均明显高于对照组 [(4.64 ± 2.56)%、 $P < 0.01$]。Transwell 侵袭实验检测结果显示, 实验组 Transwell 小室下细胞数明显少于对照组, 表明水蛭提取液能够抑制细胞侵袭。

结论: 水蛭提取液在体外实验中能够抑制人视网膜母细胞瘤细胞的增殖、侵袭, 并诱导细胞凋亡。

关键词: 水蛭提取液; 视网膜母细胞瘤; 细胞周期; 细胞凋亡; 细胞侵袭

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.10.06

The inhibitory effect of leech extract on human retinoblastoma cells

Yuan-Yuan Li, Yan-Lin Zheng, Xiao-Li Liu, Hui Li, Fang Wang, Miao Zheng, Xin-Yue Zhang, Hong-Jie Ma

Foundation item: Sichuan International Science and Technology Innovation Cooperation Project (No.2019YFH0117)

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Yan-Lin Zheng, Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610000, Sichuan Province, China. zhengyanlin@cdutcm.edu.cn

Received: 2020-04-25 Accepted: 2020-09-04

Abstract

• AIM: To evaluate the effect of leech extract on human retinoblastoma WERI-RB-1 cells.

• METHODS: WERI - RB - 1 cells with different concentrations of leech extracts (0.02, 0.04, 0.08 and 0.16U/mL) were cultured *in vitro* for 0, 24, 48 and 72h. The optimal drug intervention concentration and time were selected by CCK - 8 method for subsequent experiments. WERI - RB - 1 cells cultured *in vitro* were divided into control group (normal culture medium) and experimental group (culture medium containing leech extract). Flow cytometry was used to detect the effects of drugs on cell cycle and cell apoptosis, and Transwell invasion assay was used to detect the effects of drugs on cell invasion ability.

• RESULTS: According to the detection results of CCK-8 method, the optimal intervention conditions were 0.04 and 0.08U/mL leech extract for 48h. The cells in the leech extract intervention were mainly blocked at G2/M stage, and the positive cell rates in the 0.04 and 0.08U/mL groups were (12.59 ± 5.36)% and (14.79 ± 4.12)%, respectively, which were significantly higher than those in the control group [(3.00 ± 2.32)%, $P < 0.01$]. The apoptosis rate of the cells in the 0.04 and 0.08U/mL groups was (37.91 ± 3.44)% and (33.05 ± 2.25)%, respectively, which were significantly higher than that in the control group [(4.64 ± 2.56)%, $P < 0.01$]. The results of Transwell invasion assay showed that the number of cells under the Transwell chamber in the experimental group was significantly than that in the control group, indicating that the leech extract could inhibit cell invasion.

• CONCLUSION: The leech extract can inhibit the proliferation and invasion of human retinoblastoma cells and induce cell apoptosis *in vitro*.

• KEYWORDS: leech extract; retinoblastoma; cell cycle; apoptosis; cell invasion

Citation: Li YY, Zheng YL, Liu XL, *et al.* The inhibitory effect of leech extract on human retinoblastoma cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(10):1693-1698

0 引言

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是一种起源于原始视网膜层的人类恶性肿瘤,是主要发生于儿童的常见眼内恶性肿瘤^[1-2]。据估计,全世界每年约有8000名儿童发生RB,占有儿童癌症的3%,与RB相关的死亡约占所有婴儿死亡的1%^[3]。在RB治疗中,最常用的治疗方案是化疗联合免疫治疗^[4],但这种治疗易产生各种副作用,包括对RB细胞产生的细胞毒性、RB进程的加速、肿瘤对化疗药物的耐药性等^[5-6]。此外,RB多发生于儿童,患者的身体功能较弱、长期化疗对儿童健康的影响不容忽视。这意味着开发其他毒副作用小的药物,或辅助化疗、降低化疗药物副作用的药物非常必要^[7-8]。

中药作为天然药物,具有不良反应少、遗传毒性低等优点,可以在治疗癌症的同时对机体功能从根本上进行调理^[9]。随着中药药理研究的进一步深入,临床应用日益广泛,无论是中药单体有效成分,还是中药复方,中医中药在防治肿瘤疾病方面均已取得重要进展,基础实验及临床研究均揭示了中医中药在治疗肿瘤病变方面的显著优势。目前,常用的抗肿瘤药物有通关藤、鸦胆子、人参、麦冬、黄芪、苦参、薏苡仁、水蛭等^[10]。

视网膜母细胞瘤归属于中医“癥瘕积聚”的范畴,主要治疗手段有清热解毒、活血化瘀、扶正培本、益气养阴、软坚散结、以毒攻毒等。水蛭能破血逐瘀,通经消症,主要治疗血瘀经闭症、瘕痞块及跌打损伤病,临床上水蛭被用于治疗食管癌、胃癌、肠癌、子宫癌、乳腺癌等肿瘤具有较好的疗效^[11]。我们前期研究发现,水蛭具有抑制成纤维细胞增生的作用^[12],故推测水蛭对RB细胞可能也具有抑制作用。因此,本研究旨在评估水蛭提取液对人视网膜母细胞瘤 WERI-RB-1 细胞系的活性、周期、凋亡、侵袭等方面的影响,为水蛭抗肿瘤的临床应用提供前期基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人视网膜母细胞瘤 WERI-RB-1 细胞系,来源于中国科学院上海生命科学研究院,编号:3131C0001001200012。

1.1.2 主要试剂 水蛭干粉(兰州安泰堂中药饮片公司,原产地:中国安徽,生产批号:14082702,GMP证书号:甘J0071),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Clark), RPMI-1640 培养基(Gibco), CCK-8 试剂盒(Glpbio), 双抗(Hyclone), Annexin V-APC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(BestBio), Matrigel 基底胶(Solarbio), MTT(Biofrox), 碘化丙啶(propidium iodide, PI, Amresco), RNaseA(Sigma), 4%多聚甲醛(Biosharp)。

1.1.3 主要仪器设备 细胞培养箱(三洋电机国际贸易有限公司), 流式细胞仪(BD公司), 倒置生物显微镜(Olympus公司)。

1.2 方法

1.2.1 水蛭提取液的配制 水蛭提取液采用水提法配制。20g水蛭干粉溶于40mL PBS,以此比例混合,根据《中华药典》中使用凝血酶测定水蛭提取液中水蛭素的浓度,经

过多次反复提取及测定,水蛭提取液中水蛭素浓度稳定在0.04U/mL。

1.2.2 CCK-8 试剂盒检测药物对细胞活性的影响 (1)细胞铺板:取对数生长期的 WERI-RB-1 细胞,调节细胞密度为 2×10^5 cells/mL。接种于 96 孔细胞板中,每孔加入 100 μ L 细胞悬液,细胞培养箱中培养过夜。(2)药物浓度稀释:将上述配制的水蛭提取液用完全培养基稀释至终浓度 0(对照组)、0.02、0.04、0.08、0.16U/mL。(3)药物处理细胞:将 96 孔细胞板中每孔中旧培养基吸去,添加 100 μ L 含相应药物浓度的培养基。每个药物浓度设 6 个复孔。以不含药物、仅在培养基中生长的细胞作为对照组 A;以不含药物和细胞、仅有培养基作为对照组 B。分别于细胞培养箱中培养 0、24、48、72h。(4)CCK-8 试剂处理:根据 CCK-8 试剂盒说明书,按 CCK-8 试剂:培养基 = 1:10 的比例配制工作液。每孔加 100 μ L CCK-8 工作液,震荡细胞培养板混匀后,细胞培养箱孵育 0.5~4h。(5)检测:从添加 CCK-8 试剂开始计时,每 30min 进行 1 次酶标仪检测,测定 450nm 处的吸光度(OD)值。取组间差异显著的检测时间点数据进行分析。计算药物对细胞增殖的抑制率,细胞增殖抑制率 = $(OD_{\text{对照组A}} - OD_{\text{实验组}}) / (OD_{\text{对照组A}} - OD_{\text{对照组B}}) \times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞技术检测药物对细胞周期分布的影响

将 WERI-RB-1 细胞(5×10^5 cells/mL)接种于 6 孔板中,置于细胞培养箱中培养 24h。待细胞生长状态良好后,离心更换终浓度为 0.04、0.08U/mL 的水蛭提取液含药培养基处理 48h(实验组药物作用浓度和时间根据 CCK-8 检测结果确定),对照组加入不含水蛭提取液的培养基培养 48h。离心弃去培养基后使用预冷的 PBS 清洗 2 遍,分别收集各组细胞,预冷的 70%乙醇固定细胞后-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存固定 48h,离心,收集细胞沉淀,加入终浓度为 1mg/mL RNaseA 和 50 μ g/mL PI 染色液后进行流式细胞仪检测,分析细胞周期的分布。每组设 6 个重复。

1.2.4 流式细胞技术检测药物对细胞凋亡的影响

取对数生长期的 WERI-RB-1 细胞,调节细胞密度 5×10^5 cells/mL, 2mL/孔接种于 6 孔板中,置于细胞培养箱中培养 24h,待细胞生长状态良好后,离心更换终浓度为 0.04、0.08U/mL 的水蛭提取液含药培养基处理 48h(实验组药物作用浓度和时间根据 CCK-8 检测结果确定),对照组加入不含水蛭提取液的培养基培养 48h。将细胞液移入 1.5mL 管中,1000r/min 离心 5min,吸除上清液,PBS 洗涤 1 次,吸除上清液,用 500 μ L 4%多聚甲醛固定 30min, PBS 洗涤 1 次,吸除上清液,用 500 μ L Binding Buffer 重悬细胞后,加入 5 μ L Annexin V-APC 轻轻吹匀,再加入 5 μ L PI 混匀,室温避光反应 15min,上机检测分析。每组设 6 个重复。

1.2.5 Transwell 侵袭实验检测药物对细胞侵袭能力的影响

从-20 $^{\circ}$ C 冰箱中取出 Matrigel 基质胶,将其置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜融化。Matrigel 与无血清培养基以 1:8 的比例稀释,吸取 80 μ L 加入 Transwell 的上室中,放置于培养箱中孵育 2h。取对数生长期的细胞,更换无血清培养基培养过夜,收集细胞,1000r/min 离心 5min,吸除上清液,调节

表 1 水蛭提取液对细胞增殖抑制率的影响

($\bar{x} \pm s, \%$)

作用时间	水蛭提取液作用浓度(U/mL)			
	0.02	0.04	0.08	0.16
0h	2.79±3.14	-3.54±2.86	-1.77±2.93	3.04±2.49
24h	-2.24±3.28	3.56±4.17	0.49±3.85	15.9±3.26
48h	-0.78±2.59	9.7±3.59	9.92±4.17	30.4±4.61
72h	-2.23±4.28	18.4±2.18	25.6±3.42	44.9±2.53

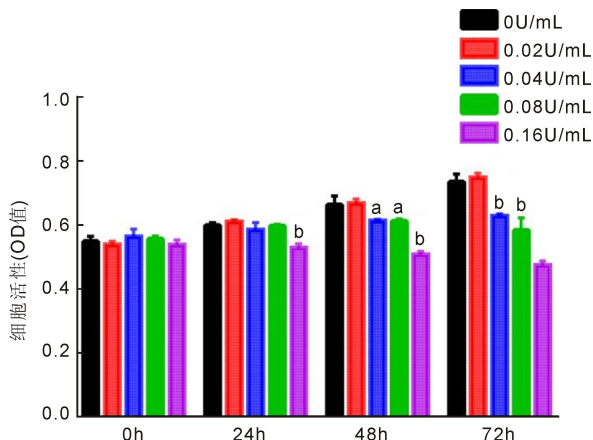


图 1 水蛭提取液对 WERI-RB-1 细胞活性的影响 $F_{0h} = 2.3, P_{0h} > 0.05; F_{24h} = 37.7, P_{24h} < 0.05; F_{48h} = 124.1, P_{48h} < 0.01; F_{72h} = 98.6, P_{72h} < 0.01$ 。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 同时间 0U/mL。

细胞密度为 1×10^6 cells/mL, $200 \mu\text{L}$ /孔接种于 Transwell 小室中,分为对照组(培养基+细胞), 0.04U/mL 实验组(0.04U/mL 的水蛭提取液含药培养基+细胞)和 0.08U/mL 实验组(0.08U/mL 的水蛭提取液含药培养基+细胞), Transwell 下室加入 $600 \mu\text{L}$ 含 10% 血清的培养基, 细胞培养箱恒温培养 48h。PBS 洗涤, 100% 乙醇固定 30min, PBS 洗涤 2 次, 0.1% 结晶紫染色 15min, PBS 洗去多余结晶紫, 于显微镜下对下室细胞进行拍照。因穿过细胞过多无法通过计数获得准确的细胞数故本研究采用间接计数法, 于 24 孔板中加入 $500 \mu\text{L}$ 含 0.5mg/mL MTT 的完全培养基, 将下室置于其中, 37°C 孵育 4h 后取出, 于孔板中加入 $500 \mu\text{L}$ DMSO, 振荡 10min, 取出下室, 将 24 孔板中的液体吸至 96 孔板中于酶标仪 570nm 处检测 OD 值。每组重复 6 次。

统计学分析: 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 采用 GraphPad Prism 7 软件制图。计量资料均符合正态分布, 方差齐, 采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 若差异有统计学意义进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度水蛭提取液对细胞活性的影响 CCK-8 法检测水蛭提取液对 WERI-RB-1 细胞活性(图 1)和增殖抑制率(表 1)结果显示, 作用 24、48、72h 时, 0.02U/mL 水蛭提取液组细胞活性与对照组均无明显差异($P > 0.05$), 且细胞增殖抑制率均为负数, 表明 0.02U/mL 水蛭提取液可在一定程度上促进细胞增殖; 作用 24h 时, 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液组细胞活性与对照组均无明显差异

($P > 0.05$), 对细胞增殖具有一定的抑制作用, 但细胞抑制率较小; 作用 48、72h 时, 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液组细胞活性均较对照组明显降低($P < 0.05$), 且均可抑制细胞增殖; 作用 24、48、72h 时, 0.16U/mL 水蛭提取液组细胞活性均较对照组明显降低($P < 0.01$), 细胞增殖抑制率分别为(15.9±3.26)%、(30.4±4.61)%、(44.9±2.53)%, 表明 0.16U/mL 水蛭提取液作用 48、72h 时可产生明显的细胞毒性, 故本研究选择 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液作用 48h 为最佳干预条件进行后续实验。

2.2 水蛭提取液对细胞周期的影响 流式细胞技术检测结果显示, 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液处理 WERI-RB-1 细胞 48h, 细胞周期主要阻滞在 G2/M 期(图 2A), 对照组、0.04U/mL 实验组、0.08U/mL 实验组 G2/M 期阳性细胞率分别为(3.00±2.32)%、(12.59±5.36)%、(14.79±4.12)%, 差异有统计学意义($F = 476.3, P < 0.001$), 且实验组 G2/M 期阳性细胞率均明显高于对照组($P < 0.01$, 表 2, 图 2B)。

2.3 水蛭提取液对细胞凋亡的影响 流式细胞技术检测结果显示, 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液处理 WERI-RB-1 细胞 48h, 细胞凋亡率明显升高(图 3)。对照组、0.04U/mL 实验组、0.08U/mL 实验组细胞凋亡率分别为(4.64±2.56)%、(37.91±3.44)%、(33.05±2.25)%, 差异有统计学意义($F = 792.6, P < 0.001$), 且实验组细胞凋亡率均明显高于对照组($P < 0.01$, 表 3)。

2.4 水蛭提取液对细胞侵袭能力的影响 Transwell 侵袭实验检测结果显示, 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液处理 WERI-RB-1 细胞 48h, 实验组 Transwell 小室下细胞数明显少于对照组, 表明实验组细胞侵袭被抑制(图 4)。MTT 法统计 Transwell 下室细胞数结果显示, 对照组、0.04U/mL 实验组、0.08U/mL 实验组 OD 值分别为 1.21 ± 4.36 、 0.44 ± 2.08 、 0.53 ± 3.42 , 差异有统计学意义($F = 2537.4, P < 0.001$), 且实验组 OD 值均明显低于对照组($P < 0.01$)。

3 讨论

水蛭(hirude nipponica whitman)作为一种传统的活血化瘀类中药, 其用于治疗肿瘤有较悠久的历史。虫类药性喜攻逐走窜, 通经达络, 搜剔疏利, 无处不至, 以治疗诸多疑难杂症、沉疴痼疾而著称^[11]。现代医学研究表明水蛭主要通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、抗血小板聚集和抗凝血作用、提高机体免疫力、抗肿瘤多药耐药性(multidrug resistance MDR)的途径发挥其抗肿瘤作用^[12-13]。这为水蛭抗肿瘤的临床应用提供了理论依据, 也为临床治疗肿瘤提供了新的思路^[14]。但是由于水蛭有效成分的多样性和视网膜母细胞瘤发病

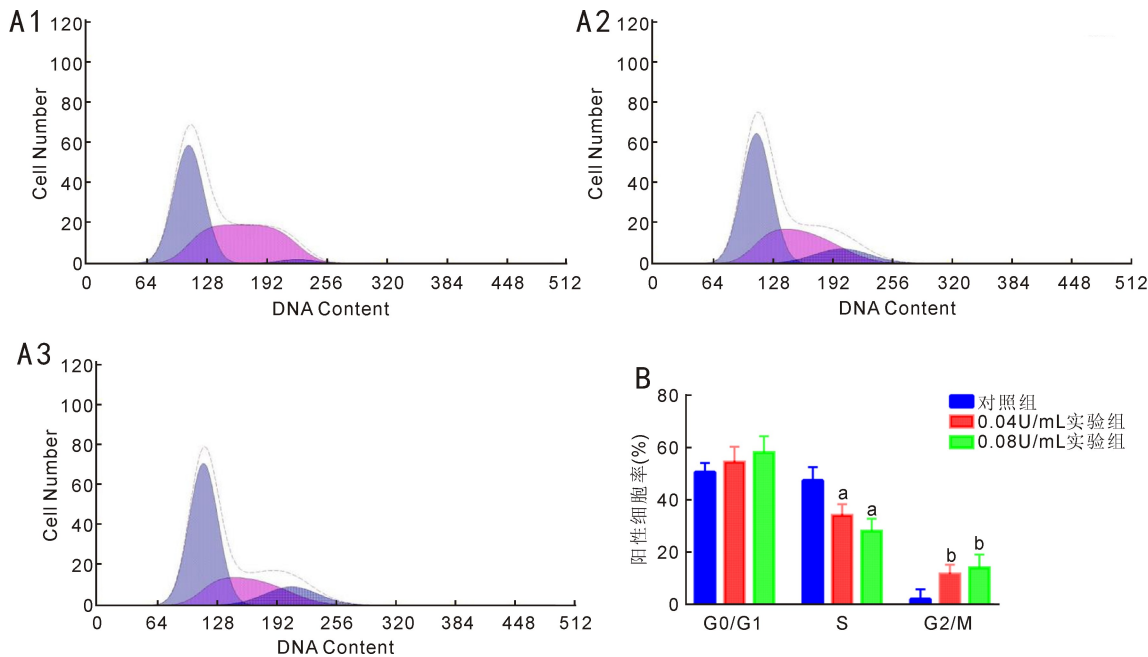


图2 水蛭提取液对 WERI-RB-1 细胞周期的影响 A: 流式细胞仪检测细胞周期结果图 (A1: 对照组; A2: 0.04U/mL 实验组; A3: 0.08U/mL 实验组); B: 各组 G0/G1、S、G2/M 期阳性细胞率统计图; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

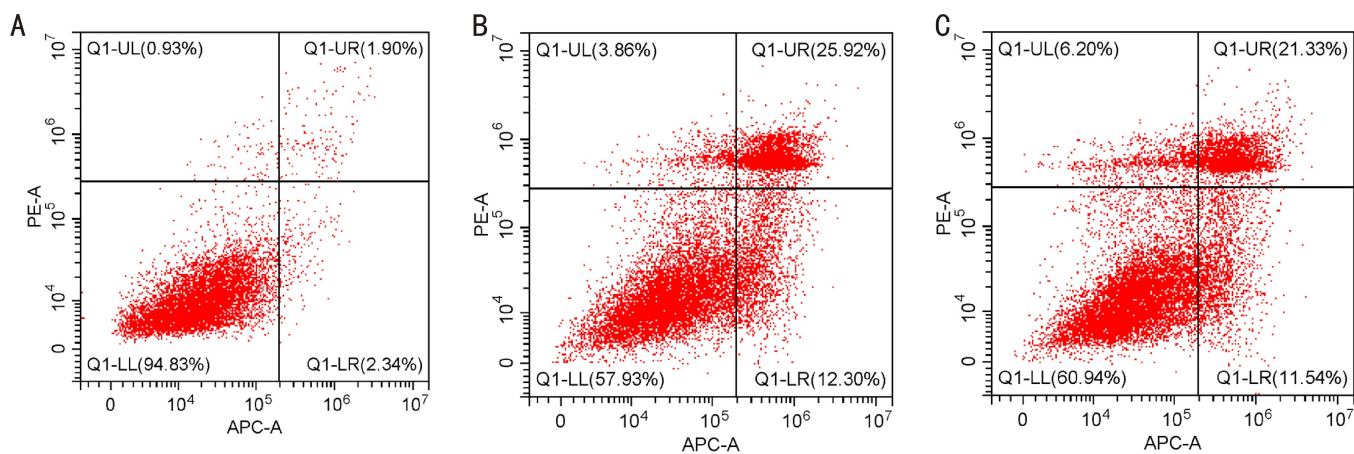


图3 流式细胞仪检测水蛭提取液对 WERI-RB-1 细胞凋亡的影响 A: 对照组; B: 0.04U/mL 实验组; C: 0.08U/mL 实验组。

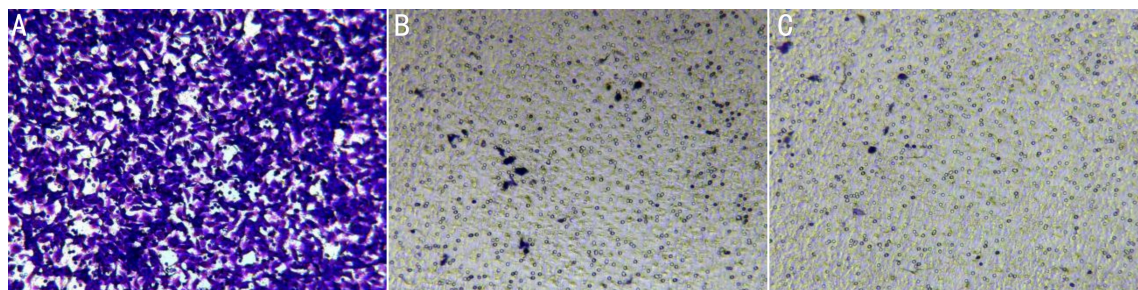


图4 Transwell 侵袭实验结果 (Transwell 小室下细胞, $\times 200$) A: 对照组; B: 0.04U/mL 实验组; C: 0.08U/mL 实验组。

表2 水蛭提取液对细胞周期分布的影响

组别	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
对照组	50.64 \pm 4.08	45.35 \pm 5.81	3.00 \pm 2.32
0.04U/mL 实验组	53.99 \pm 3.49	33.42 \pm 4.87 ^a	12.59 \pm 5.36 ^b
0.08U/mL 实验组	57.47 \pm 4.75	27.75 \pm 3.37 ^a	14.79 \pm 4.12 ^b
<i>F</i>	41	278.2	476.3
<i>P</i>	>0.05	<0.001	<0.001

注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表3 水蛭提取液对细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	正常细胞	凋亡细胞	死亡细胞
对照组	94.52±3.15	4.64±2.56	0.84±2.59
0.04U/mL 实验组	57.82±2.43	37.91±3.44 ^b	2.47±1.87
0.08U/mL 实验组	60.47±3.31	33.05±2.25 ^b	6.48±3.27
F	85.1	792.6	365.9
P	<0.01	<0.001	<0.001

注:^bP<0.01 vs 对照组。

机制的复杂性,关于水蛭对视网膜母细胞瘤细胞的益处的研究目前还没有。因此,深入研究水蛭素对视网膜母细胞瘤的药理作用是十分必要的。

具有活性的细胞在正常生理条件下能够进行有丝分裂,保持一定的细胞增殖状态。在受到外界损伤性条件(如药物、物理刺激)影响时,可以表现为细胞增殖减慢,细胞非正常死亡增多,细胞形态学发生变化。本研究中,我们首先采用CCK-8法研究药物对细胞活性的影响,以此筛选药物最佳干预浓度和时间点。该实验方法简单易行,实验条件可控性强,最重要的是无需更换培养液,适合WERI-RB-1这样的悬浮细胞,在研究视网膜母细胞瘤的基础实验方面可以提供良好的、稳定的实验结果。分析实验结果发现,0.04、0.08U/mL水蛭提取液干预48h抑制活细胞数量效果最佳。

CCK-8检测结果已经证实水蛭提取液对WERI-RB-1细胞具有抑制增殖作用,活细胞数量减少是由于细胞周期分布阻滞,还是凋亡数量增加导致,或是通过其他的作用机制引起仍需深入研究。细胞增殖过程中细胞周期的调节进展是肿瘤进展、抗肿瘤治疗反应、免疫系统调节的关键因素^[15-16]。细胞凋亡是一种生理现象,但在肿瘤疾病中,诱导肿瘤细胞凋亡,是抑制肿瘤的关键^[17]。本研究中,我们采用流式细胞仪检测药物对细胞周期和凋亡的影响,结果显示,0.04、0.08U/mL水蛭提取液使细胞周期主要阻滞在G2/M(有丝分裂)期,且均可诱导WERI-RB-1细胞凋亡率上调。陶义丰等^[18]研究发现,水蛭素可明显抑制鼻咽癌细胞增殖,该作用可能与水蛭素上调Bax和p21 mRNA表达有关。贺彬等^[19]研究发现水蛭素和阿霉素均对人舌鳞癌细胞株TCA8113具有抑制作用,水蛭素的作用机制可能为诱导细胞凋亡并阻滞细胞周期于G0/G1(合成)期,水蛭素可增强阿霉素的敏感性,有助于阿霉素化疗过程的增效减毒作用。本研究发现,水蛭提取液使WERI-RB-1细胞周期主要阻滞在G2/M期,这与上述研究结果不同,分析其原因,可能与人视网膜母细胞瘤细胞自身生物特性有关,或与抑制凝血酶引起周期细胞活性改变有关,也可能与水蛭素与水蛭提取液本身成分不同,影响细胞周期的成分靶点不同有关。在随后的研究中,我们将进一步研究。

转移是视网膜母细胞瘤最可怕的一面,肿瘤细胞转移的可能性取决于其与促进肿瘤细胞生长、存活、血管生成、侵袭和转移的体内平衡因子之间的相互作用^[20-21]。本研究采用Transwell侵袭实验检测药物对细胞侵袭能力的影响,结果表明药物干预组Transwell下室WERI-RB-1细胞

数目均较对照组显著下调。Blankenship等^[22]从吸血水蛭ghilianii唾液腺中分离得到一种蛋白Ghilanten,研究发现其具有抑制黑色素瘤、乳腺癌、肺癌和前列腺癌转移的作用,这与本研究结果相似。

综上所述,本研究从细胞生物学角度研究水蛭提取液对人视网膜母细胞瘤WERI-RB-1细胞的影响,结果证明水蛭提取液可有效抑制细胞增殖和侵袭,并诱导细胞凋亡。水蛭提取液通过对视网膜母细胞瘤WERI-RB-1细胞活性抑制、周期阻滞、诱导凋亡、抑制侵袭发挥作用,有望成为视网膜母细胞瘤的治疗药物。然而,本研究也存在不足之处,如药物的剂量效应关系、时间效应关系实验还不够详细,未设立阳性常用药物对照组等,水蛭提取液抑制视网膜母细胞瘤的分子机制还需深入研究。

参考文献

- Mendoza PR, Grossniklaus HE. Therapeutic options for retinoblastoma. *Cancer Control* 2016; 23(2): 99-109
- Li YY, Zheng YL. Hypoxia promotes invasion of retinoblastoma cells *in vitro* by upregulating HIF-1 α /MMP9 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(23): 5361-5369
- Chairissy MD, Wulandari LR, Sujuti H. Physalis angulata pro-apoptotic and anti-proliferative effects of leaf extract on retinoblastoma cells. *Int J Ophthalmol* 2019; 12(9): 1402-1407
- Wang Y, Sun D, Sheng Y, et al. XIST promotes cell proliferation and invasion by regulating miR-140-5p and SOX4 in retinoblastoma. *World J Surg Oncol* 2020; 18(1): 1-8
- N'Diaye M, Vergnaud-Gauchon J, Nicolas V, et al. Hybrid lipid polymer nanoparticles for combined chemo- and photodynamic therapy. *Mol Pharm* 2019; 16(9): 4045-4058
- Cocarta AI, Hobzova R, Sirc J, et al. Hydrogel implants for transscleral drug delivery for retinoblastoma treatment. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019; 103:109799
- Xu L, Li W, Shi Q, et al. MicroRNA-936 inhibits the malignant phenotype of retinoblastoma by directly targeting HDAC9 and deactivating the PI3K/AKT pathway. *Oncol Rep* 2020; 43(2): 635-645
- Huo Y, Wang Q, Liu Y, et al. A temperature-sensitive phase-change hydrogel of topotecan achieves a long-term sustained antitumor effect on retinoblastoma cells. *Onco Targets Ther* 2019; 12: 6069-6082
- Choudhari AS, Mandave PC, Deshpande M, et al. Phytochemicals in cancer treatment: from preclinical studies to clinical practice. *Front Pharmacol* 2019; 10: 1614
- 裴晓华, 彭艳梅. 中医药治疗恶性肿瘤70年. *中国肿瘤外科杂志* 2019; 11(5): 305-308
- 黄秋阳, 冷静, 甘奇超, 等. 水蛭及其制剂在心脑血管疾病中的应用. *中成药* 2019; 41(8): 1915-1920
- Peng L, Pan X, Yin G, et al. Natural hirudin increases rat flap viability by anti-inflammation via PARs/p38/NF- κ B pathway. *Biomed Res Int* 2015; 2015:597264
- 季漪, 李柳, 吴勉华. 水蛭抗肿瘤作用机制研究进展. *中国中医药信息杂志* 2015; 22(3): 131-133
- Dai H, Zeng W, Luo H, et al. C-MET-dependent signal transduction mediates retinoblastoma growth by regulating PKM2 nuclear translocation. *Cell Biochem Funct* 2020; 38(2): 204-212
- Behbehani GK. Cell cycle analysis by mass cytometry. *Methods Mol Biol* 2018; 1686:105-124
- Sachdeva UM, O'Brien JM. Understanding pRb: toward the necessary

development of targeted treatments for retinoblastoma. *J Clin Invest* 2012; 122(2): 425-434
17 Pan ST, Li ZL, He ZX, *et al.* Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2016; 43(8): 723-737
18 陶义丰, 黄玲莎, 刘东华, 等. 水蛭素对人鼻咽癌细胞增殖的影响及机制. *山东医药* 2018; 58(33): 43-46
19 贺彬, 苏承武, 蔡捷. 水蛭素联合阿霉素对人舌鳞癌细胞株 TCA8113 作用机制的研究. *现代中西医结合杂志* 2011; 20(12):

1447-1450
20 Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *J Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 453-458
21 Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis. *Cancer Res* 2010; 70(14): 5649-5669
22 Blankenship DT, Brankamp RG, Manley GB, *et al.* Amino acid sequence of ghilanten; anticoagulant-antimetastatic principle of the south american leech. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 166(3): 1384-1389

国际眼科杂志中文版(IES)近5年影响因子趋势图

