

阿昔洛韦对体外培养人眼 Tenon 囊成纤维细胞增殖迁移的影响

吴靖怡, 吴志航, 李淑婷, 刘 瑶

引用: 吴靖怡, 吴志航, 李淑婷, 等. 阿昔洛韦对体外培养人眼 Tenon 囊成纤维细胞增殖迁移的影响. 国际眼科杂志 2021; 21(1):32-36

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金资助项目 (No. BK20190162)

作者单位: (213000) 中国江苏省常州市第一人民医院眼科

作者简介: 吴靖怡, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 青光眼。

通讯作者: 刘瑶, 毕业于复旦大学医学院, 博士, 硕士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 眼底病. Jiahl2000@163.com

收稿日期: 2019-12-19 修回日期: 2020-12-04

摘要

目的: 探索阿昔洛韦 (ACV) 对体外培养人眼 Tenon 囊成纤维细胞 (HTFs) 的增殖和凋亡的影响以及作用机制。

方法: 将 HTFs 分为 ACV 处理组和空白组; CCK8 检测不同浓度梯度下的细胞增殖速率, 划痕实验检测 HTFs 迁移能力, 流式细胞术检测 HTFs 凋亡以及细胞周期。

结果: 与空白组相比, ACV 处理组 (终浓度分别为 1.125、2.25、3.375、4.5 mmol/L) HTFs 增殖速率显著降低 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性。4.5 mmol/L ACV 处理组划痕细胞迁移率显著降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著增加 ($P = 0.0005$), 细胞周期 G0/G1 期峰值升高 ($P = 0.0011$), S 期下降 ($P = 0.0006$), 细胞周期被阻滞在 G0/G1 期。

结论: 阿昔洛韦可以通过阻滞 HTFs 周期促进细胞凋亡, 抑制 HTFs 的增殖和迁移。

关键词: 阿昔洛韦; 人眼 Tenon 囊成纤维细胞; 细胞增殖; 迁移; 凋亡

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.1.06

Effect of Acyclovir on proliferation and migration of human Tenon capsule fibroblasts *in vitro*

Jing-Yi Wu, Zhi-Hang Wu, Shu-Ting Li, Yao Liu

Foundation item: Youth Fund of Jiangsu Natural Science Foundation (No. BK20190162)

Department of Ophthalmology, Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yao Liu. Department of Ophthalmology, Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China. Jiahl2000@163.com

Received: 2019-12-19 Accepted: 2020-12-04

Abstract

• **AIM:** To explore the effect and mechanism of acyclovir

(ACV) on the proliferation and apoptosis of human eye Tenon capsule fibroblasts (HTFs) *in vitro*.

• **METHODS:** HTFs were divided into ACV treatment group and control group; CCK8 was used to detect cell proliferation rate under different concentration gradients, scratch assay was used to detect HTFs migration ability, and flow cytometry was used to detect HTFs apoptosis and cell cycle.

• **RESULTS:** Compared with the control group, the proliferation rate of HTFs in the ACV-treated group (final concentrations were 1.125, 2.25, 3.375, 4.5 mmol/L) was significantly reduced ($P < 0.05$) and was concentration-dependent. The scratch closure rate in the ACV-treated group (final concentrations were 4.5 mmol/L) was significantly reduced ($P < 0.05$), the apoptosis rate was significantly increased ($P = 0.0005$), the peak value of the cell cycle G0/G1 increased ($P = 0.0011$), and the S-phase decreased ($P = 0.0006$). The cell cycle is blocked in the G0/G1 phase.

• **CONCLUSION:** Acyclovir can promote cell apoptosis by blocking the cell cycle of HTFs, and inhibit the proliferation and migration of HTFs.

• **KEYWORDS:** acyclovir; HTFs; cell proliferation; migration; apoptosis

Citation: Wu JY, Wu ZH, Li ST, et al. Effect of Acyclovir on proliferation and migration of human Tenon capsule fibroblasts *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(1):32-36

0 引言

青光眼是全球公认的视力丧失和失明主要原因之一。青光眼的主要治疗方法是通过局部应用降眼压药物、激光治疗或手术降低眼压。青光眼的手术方法多种多样。但是,小梁切除术是公认的青光眼的一线外科手术方法^[1]。小梁切除术的远期成功率较低的主要原因是术后滤过泡瘢痕的形成阻碍房水外引流^[2-3]。目前术中使用抗代谢药物如 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 和丝裂霉素-C (MMC) 能够部分减轻术后滤过泡的瘢痕愈合^[4]。但是, 5-FU 和 MMC 的使用增加了滤过泡形成不良、滤过过畅、角膜缘干细胞功能的衰竭以及眼内炎等药物相关并发症的发生率^[4-5]。多种抗病毒药物已被报道通过不同机制直接参与细胞抑制和细胞毒性活动^[6-7]。阿昔洛韦 (ACV) 是临床常用抗病毒药物, 但是目前阿昔洛韦对人眼 Tenon 囊成纤维细胞 (HTFs) 的作用尚无相关研究。本研究应用 ACV 作用于体外培养 HTFs, 旨在探索 ACV 对成纤维细胞增殖和迁移影响, 为减少青光眼术后滤过泡瘢痕化, 提高青光眼滤过术的成功率提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究经苏州大学附属第三医院伦理委员会审查通过并获得患者及其家属的知情同意。取玻璃体切除手术患者的 Tenon 囊组织,剪碎,加入 0.25% 胶原酶 IV (美国 Gibco 公司),孵育 2h;离心,加入胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),孵育 30min;200 目滤网过滤,离心,加入培养基[含 20% 胎牛血清(美国 Gibco 公司),含 1% 双抗(美国 Gibco 公司)的 DMEM-F12(美国 Gibco 公司)];待细胞生长至培养皿 80% 时即可传代。传代后使用含 10% 胎牛血清,1% 双抗的 DMEM-F12 的培养基进行培养。取第 3 代细胞使用免疫荧光法进行细胞鉴定(免疫荧光显微镜及照相系统,德国 Leica),免疫荧光一抗采用 1:300 小鼠抗人单克隆抗体波形蛋白(美国 Genetex),二抗采用 1:500 山羊抗小鼠单克隆抗体(IgG)(美国 Proteintech)。取 3 至 5 代细胞进行实验。

1.2 方法

1.2.1 CCK8 检测 收集 HTFs 制成细胞悬液,接种于 96 孔板中;细胞贴壁后换无血清 DMEM-F12 培养 24h;随机分为 ACV 处理组,空白组以及标准组;ACV 处理组加入 ACV 终浓度分别为 0.45、1.125、2.25、3.375、4.5mmol/L 的无血清培养基,空白组加入无血清培养基培养,标准组为无成纤维细胞孔加入无血清 DMEM-F12 培养基,培养 72h;加入 CCK8 试剂,孵育 4h;酶标仪(美国宝特公司)测定 490nm 处的吸光度(A_{490})。计算出不同浓度阿昔洛韦对 HTFs 的抑制率,抑制率=(实验组 A_{490} 值-标准组 A_{490} 值)/(对照组 A_{490} 值-标准组 A_{490} 值)×100%。

1.2.2 划痕实验 收集 HTFs 制成细胞悬液,接种于 6 孔板中,待细胞长至 90% 时,换无血清培养基培养 24h;100 μ L 枪尖划痕;随机分为 ACV 处理组和空白组。ACV 处理组加入 ACV 终浓度分别为 2.25、4.5mmol/L 的无血清培养基,空白组加入无血清培养基培养。0、72h 取样,拍照(相差显微镜,日本 Olympus 公司)。采用 Image-J 软件计算细胞划痕距。计算细胞迁移率,细胞迁移率(%)=(T_{0h} 宽度- T_{72h} 宽度)/ T_{0h} 宽度×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测 收集 4.5mmol/L ACV 处理 24h 后 HTFs 和空白组细胞制成细胞悬液,分成两部分,一部分加入 YF488-Annexin V 和 PI 工作液(Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,美国 EVERBRIGHT),避光孵育 15min,测定细胞凋亡(流式细胞仪,美国 BD),计算细胞凋亡率。另一部分细胞加入预冷 75% 乙醇,置于-4 $^{\circ}$ C 固定过夜。后加入碘化丙啶染色液(细胞周期检测试剂盒,美国 EVERBRIGHT),避光孵育 15min,测定细胞周期(流式细胞仪,美国 BD)。

统计学分析:采用 Graphpad Prism 8 统计学软件进行统计学分析,连续变量采用均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞免疫荧光鉴定 酶消化法取原代 HTFs,培养 4~5d 可见细胞贴壁,胞体呈梭型或不规则三角形,中央有卵圆形核,生长良好,符合 HTFs 形态;采用免疫荧光进行细胞鉴定培养的细胞为 HTFs,免疫荧光显微镜下可见培养的细胞胞质中波形蛋白表达呈阳性,胞质内呈绿色染色,见图 1。

2.2 ACV 对 HTFs 增殖的影响 CCK8 检测显示,不同浓度 ACV 作用于 HTFs 的 A_{490} 值,差异有统计学意义($F = 54.8, P < 0.0001$)。与空白组对比,ACV 浓度为 0.45mmol/L 时,差异无统计学意义($t = 0.4604, P = 0.6551$);当 ACV 浓度为 1.125、2.25、3.375、4.5mmol/L 时,差异有统计学意义($t = 3.946, P = 0.0027; t = 4.660, P = 0.0009; t = 8.057, P < 0.0001; t = 12.95, P < 0.0001$),见表 1。ACV 浓度为 1.125mmol/L 与 2.25、3.375、4.5mmol/L 组间差异有统计学意义($P = 0.004, = 0.005, < 0.0001, < 0.0001$)。结果显示当 ACV 浓度达到 1.125mmol/L 时,开始对 HTFs 有抑制作用,并呈浓度依赖性。

2.3 ACV 对 HTFs 迁移活性的影响 划痕实验结果显示,不同浓度 ACV 作用于 HTFs 的细胞迁移率,差异有统计学意义($F = 15.23, P = 0.0074$),见表 1。2.25、4.5mmol/L ACV 组细胞迁移率与空白组比较差异有统计学意义($t = 2.303, P = 0.005; t = 5.019, P = 0.0074$)。ACV 浓度为 2.25mmol/L 与 4.5mmol/L 组间差异有统计学意义($t = 3.495, P = 0.025$),见图 2、3。结果显示 ACV 对 HTFs 的迁移活性有抑制作用,并且随着 ACV 浓度的增加,抑制作用增强。

2.4 ACV 对 HTFs 凋亡和细胞周期的影响 经流式细胞仪检测,空白组细胞凋亡率(2.29%±0.24%)与 4.5mmol/L ACV 处理组(7.35%±0.64%)比较差异有统计学意义($t = 10.33, P = 0.0005$),见图 4。结果显示 4.5mmol/L ACV 作用 HTFs 24h 后,HTFs 细胞凋亡增加。经流式细胞仪检测,空白组(G0/G1 期 59.97%±2.13%;S 期 23.64%±1.89%)与 ACV 处理组(G0/G1 期 74.8%±1.27%;S 期 8.77%±0.93%)比较差异有统计学意义($t = 8.434, P = 0.0011; t = 9.953, P = 0.0006$),见图 5。结果显示 4.5mmol/L ACV 作用 HTFs 24h 后,G0/G1 期峰值升高,S 期峰值下降,HTFs 细胞周期阻滞于 G0/G1 期。

3 讨论

滤过泡瘢痕的生成主要由 HTFs 的异常增殖,以及其向肌成纤维细胞的转化,分泌胶原和促纤维化因子的能力增强及细胞外基质的合成增多等引起^[8]。目前术中使用抗代谢物减轻术后滤过泡的瘢痕的生成。但是,抗代谢物的使用增加了药物相关并发症的发生率^[4-5]。因此,发现更安全有效的瘢痕抑制剂对提高青光眼滤过手术的远期成功率有深刻意义。

目前,多项研究发现抗病毒药物可通过抑制细胞增生和促进其凋亡参与细胞抑制。如西多福韦可以促进未感染病毒的间皮瘤细胞内促凋亡蛋白 p53、caspase-3 等的升高,生存蛋白 Bcl-x 的降低^[9];利巴韦林可通过减少 eIF4E 靶点的 mRNA 输出和蛋白表达从而抑制乳腺癌细胞的增殖^[10]。已有研究证实抗病毒药物 IFN γ 对 HTFs 的增殖具有明显的抑制作用。IFN α -2b 能够通过减少 HTFs 中 TGF- β 1、TGF- β 2 的表达,从而减少 I 型胶原蛋白及纤维连接蛋白的表达,参与抑制 HTFs 的增殖^[11-12]。ACV 是一种合成鸟苷类似物,作为传统抗病毒药物,阿昔洛韦滴眼液在眼科局部应用有长期临床经验,安全性高,耐受性良好^[13-14]。Benedetti 等^[15]发现 ACV 可以抑制白血病细胞的活性并诱导其凋亡,并且用 ACV 预处理白血病细胞,可以增强细胞对 5-FU 的敏感性。但目前 ACV 对 HTFs 的作用尚无相关研究。

ACV 微溶于水,在水中的溶解性为 3.3~5.7mmol/L,

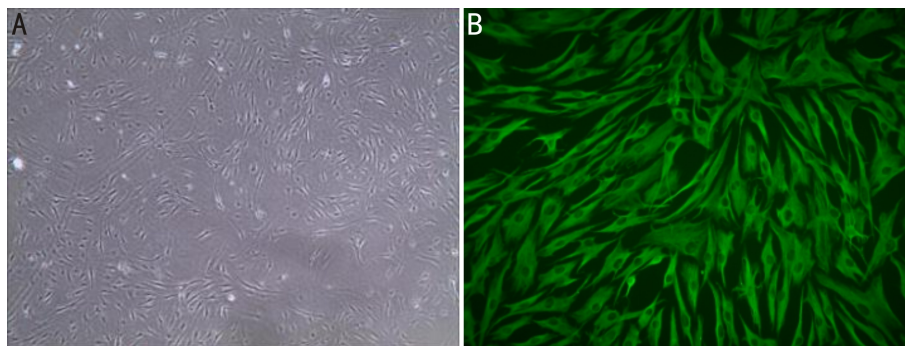


图1 细胞免疫荧光鉴定结果 A:原代人 Tenon 囊成纤维细胞($\times 40$);B:HTFs 免疫荧光鉴定($\times 400$)。

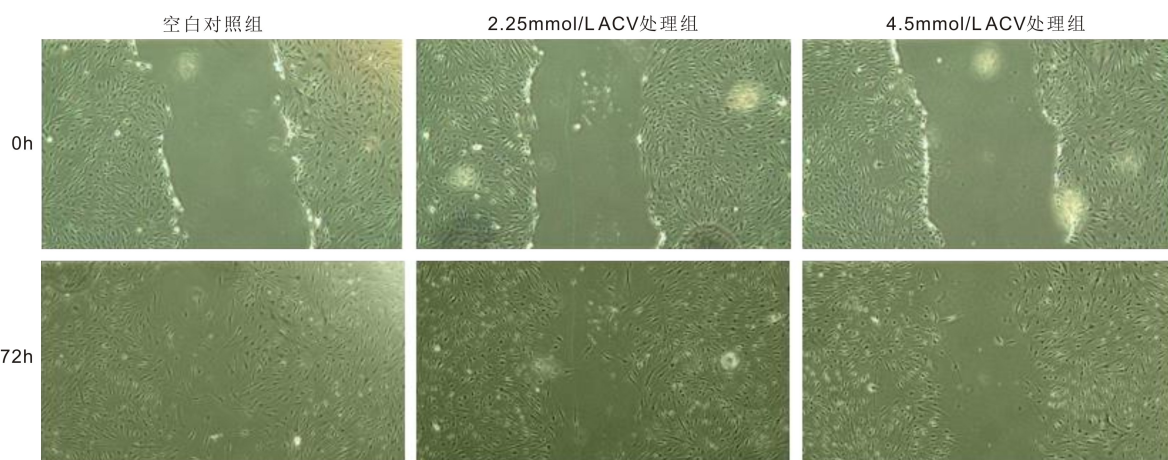


图2 不同浓度 ACV 作用抑制 HTFs 的细胞迁移($\times 400$)。

表1 不同浓度阿昔洛韦作用后对 HTFs 的抑制作用和迁移活性的影响

组别	样本量	A_{490} 值	抑制率(%)	细胞迁移率(%)	$\bar{x} \pm s$
空白对照组	6	1.078 ± 0.057	-	57.20 ± 7.43	
ACV 处理组 (mmol/L)					
0.45	6	1.066 ± 0.023	-	-	
1.125	6	0.942 ± 0.024	4.575 ± 3.26	-	
2.25	6	0.870 ± 0.087	11 ± 4.09	41.77 ± 5.92	
3.375	6	0.774 ± 0.048	19.55 ± 3.87	-	
4.5	6	0.736 ± 0.025	25.925 ± 2.56	28.16 ± 3.43	
<i>F</i>		54.8	-	15.23	
<i>P</i>		<0.0001	-	0.0074	

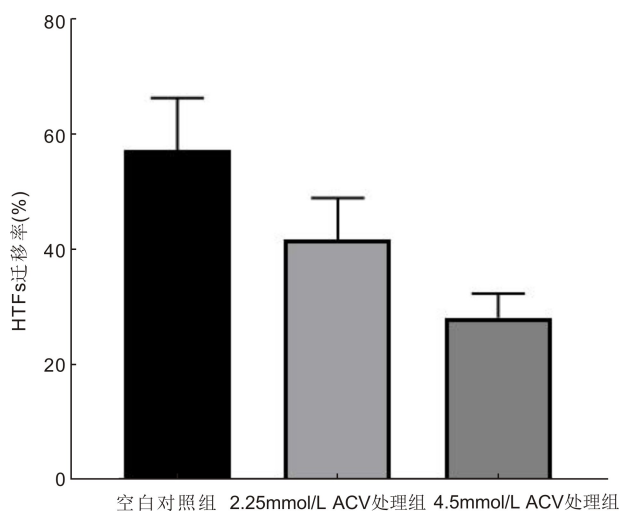


图3 不同浓度 ACV 作用 72h 对 HTFs 迁移率的影响。

随着温度的改变而改变^[16-17]。本实验中观察到,当 ACV 浓度高于 4.5mmol/L 时,溶液有沉淀析出。因此,本实验采用 ACV 最大浓度为 4.5mmol/L。首先,本实验通过 CCK8 证实 ACV 抑制 HTFs 增殖。选择不同浓度 ACV 作用于 HTFs,CCK8 检测结果显示 ACV 对 HTFs 有抑制作用,并且随着 ACV 浓度的增长,对 HTFs 的抑制作用逐渐增强。在后续的细胞凋亡和细胞周期检测中,采用本实验中 ACV 的最高药物浓度 4.5mmol/L。流式细胞仪检测结果显示,ACV 处理后,HTFs 细胞周期 G0/G1 期的峰值增高,S 期下降,细胞周期阻滞于 G0/G1 期,并且细胞凋亡率明显升高。提示 ACV 可能通过阻滞细胞周期,抑制 HTFs 的增殖,促进细胞凋亡。划痕实验结果显示 ACV 对 HTFs 向周边的迁移具有明显的抑制作用。成纤维细胞可通过迁徙、增殖、分泌胶原等生物学行为参与创面修复过程^[18]。因此通过减弱成纤维细胞迁移运动,进一步减少其增殖,可以减轻瘢痕的生成。有研究发现,小鼠腹腔注

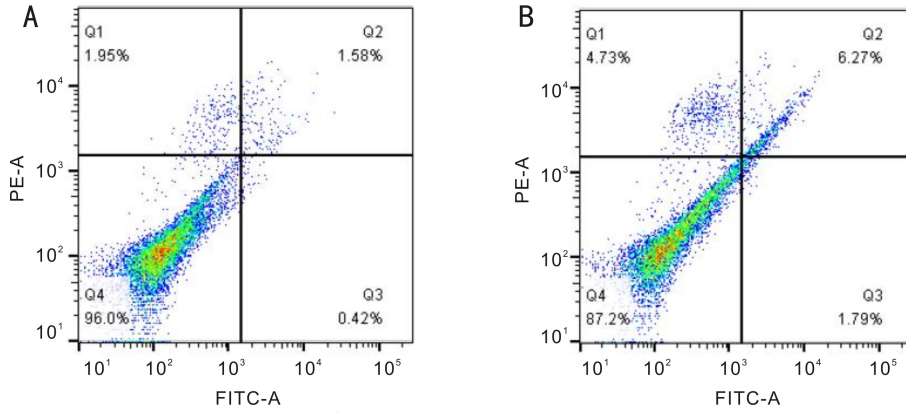


图4 4.5mmol/L ACV 诱导 HTFs 凋亡结果 A:空白对照组;B:4.5mmol/L ACV 处理组。

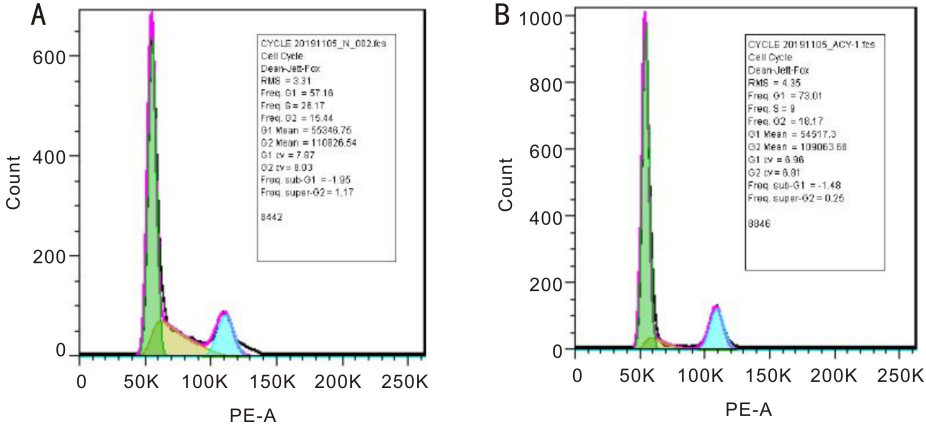


图5 4.5mmol/L ACV 阻滞 HTFs 细胞周期结果 A:空白对照组;B:4.5mmol/L ACV 处理组。

射 ACV 后,肾脏组织的 VEGF 及其受体以及成纤维细胞生长因子 (FGF) 表达水平降低^[19]。提示 ACV 可以抑制 VEGF 及其受体的生成。VEGF 被认为是血管内皮细胞生长最常见的刺激因子^[20]。有研究发现 VEGF 及其受体在 HTFs 中呈高表达,VEGF 可直接促进 HTFs 的增生和迁移^[21]。Park 等^[22]研究表明,VEGF 诱导 TGF- β 1 蛋白的产生,并且呈剂量依赖性。TGF- β 被认为是青光眼滤过术后瘢痕形成的关键因子。由此推测 ACV 可能通过抑制 VEGF 从而降低 TGF- β 1 的水平,进而抑制 HTFs 的增殖,诱导其凋亡,与干扰素类似。

综上所述,通过本实验可以得出如下初步结论:ACV 可以通过诱导 HTFs 细胞周期阻滞,抑制 HTFs 的增殖,从而诱导其凋亡,并且能通过削弱 HTFs 的迁移能力抑制 HTFs 向周边侵袭和转移。这一研究结果有望应用于青光眼术后抑制滤过泡瘢痕化,为提高青光眼滤过术长期成功率提供新思路。本实验未进一步深入探讨 ACV 阻滞细胞周期的作用机制,其确切的信号通路有待进一步研究。并且 ACV 能否提高 5-FU 对于青光眼术后成纤维细胞的敏感性,有望在后续实验中进一步深入探讨。

参考文献

1 Gedde SJ, Herndon LW, Brandt JD, et al. Tube Versus Trabeculectomy Study Group. Postoperative complications in the Tube Versus Trabeculectomy (TVT) study during five years of follow-up. *Am J Ophthalmol* 2012;153(5):804-814
 2 孔亚男, 陆宏, 陈颖, 等. 青光眼滤过术后瘢痕形成机制及抗瘢痕化研究进展. *国际眼科杂志* 2019; 19(10):1688-1691
 3 Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol* 2003; 48(3):314-346

4 Joshi AB, Parrish RK 2nd, Feuer WF. 2002 survey of the American Glaucoma Society: practice preferences for glaucoma surgery and antifibrotic use. *J Glaucoma* 2005;14(2):172-174
 5 Seibold LK, Sherwood MB, Kahook MY. Wound Modulation After Filtration Surgery. *Surv Ophthalmol* 2012;57(6):530-550
 6 Georgoulas S, Dahlmann-Noor A, Brocchini S, et al. Modulation of wound healing during and after glaucoma surgery. *Prog Brain Res* 2008; 173:237-254
 7 Holló G. Wound healing and glaucoma surgery: modulating the scarring process with conventional antimetabolites and new molecules. *Dev Ophthalmol* 2017;59:80-89
 8 李柯, 聂圣琼, 郑雅娟. 肌成纤维细胞在青光眼滤过术后伤口愈合中的研究进展. *国际眼科杂志* 2018;18(10):1806-1809
 9 Catalani S, Palma F, Battistelli S, et al. Reduced cell viability and apoptosis induction in human thyroid carcinoma and mesothelioma cells exposed to cidofovir. *Toxicol In Vitro* 2017;41:49-55
 10 Pettersson F, Yau C, Dobocan MC, et al. Ribavirin Treatment Effects on Breast Cancers Overexpressing eIF4E, a Biomarker with Prognostic Specificity for Luminal B-Type Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(9):2874-2884
 11 蓝育青, 葛坚, 林明楷, 等. MTT 法检测干扰素- γ 对人眼 Tenon 囊成纤维细胞增殖的抑制效应. *实用医学杂志* 2002;2:123-125
 12 陈君毅, 孙兴怀, 笪翠弟, 等. 干扰素 α -2b 对人眼 Tenon 囊成纤维细胞纤维化作用的影响. *中国眼耳鼻喉科杂志* 2011;11(5):277-280
 13 Michael. Acyclovir. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2019:45-46
 14 Li P, Wang S, Chen H, et al. A novel ion-activated *in situ* gelling ophthalmic delivery system based on κ -carrageenan for acyclovir. *Drug Dev Ind Pharm* 2018;44(5):829-836

15 Benedetti S, Catalani S, Palma F, *et al.* Acyclovir induces cell cycle perturbation and apoptosis in Jurkat leukemia cells, and enhances chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Life Sci* 2018;215:80-85

16 Wong TT, Toh LZ, Chu SWL, *et al.* Novel Insight into the Inflammatory and Cellular Responses Following Experimental Glaucoma Surgery: A Roadmap for Inhibiting Fibrosis. *Curr Mol Med* 2013;13(6):911-928

17 Mietz H, Chávez-Barrios P, Lieberman MW. A mouse model to study the wound healing response following filtration surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;236(6):467-475

18 Zhang Z, Finnerty CC, He J, *et al.* Smad ubiquitination regulatory factor 2 expression is enhanced in hypertrophic scar fibroblasts from

burned children. *Burns* 2012;38(2):236-246

19 Lu H, Han YJ, Xu JD, *et al.* Proteomic characterization of acyclovir-induced nephrotoxicity in a mouse model. *PLoS One* 2014; 9(7):e103185

20 Bates DO, Jones RO. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res* 2009;153(2):347-358

21 Chua BE, Nguyen DQ, Qin Q, *et al.* Bleb vascularity following post-trabeculectomy subconjunctival bevacizumab: a pilot study. *Clin Exp Ophthalmol* 2012;40(8):773-779

22 Park HYL, Kim JH, Park CK. VEGF Induces TGF- β 1 Expression and Myofibroblast Transformation after Glaucoma Surgery. *Am J Pathol* 2013;182(6):2147-2154