

苏拉明联合地塞米松对体外培养的视网膜色素上皮细胞增殖的影响

林琳¹, 吴雅臻²

作者单位: ¹(210029) 中国江苏省南京市, 江苏省中医院眼科; ²(130041) 中国吉林省长春市, 吉林大学第二附属医院眼科
作者简介: 林琳, 女, 毕业于吉林大学第二附属医院眼科, 硕士, 研究方向: 眼底病及斜视。
通讯作者: 吴雅臻, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 眼底病。
wyazhen@sohu.com
收稿日期: 2010-06-04 修回日期: 2010-09-27

Effects of suramin combined with dexamethasone on proliferation of cultured retinal pigment epithelial cells *in vitro*

Lin Lin¹, Ya-Zhen Wu²

¹Department of Ophthalmology, Jiangsu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China
Correspondence to: Ya-Zhen Wu, Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China. wyazhen@sohu.com
Received: 2010-06-04 Accepted: 2010-09-27

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of suramin combined with dexamethasone on proliferation of cultured pig retinal pigment epithelial (RPE) cells.
• **METHODS:** Cultured RPE cells were treated with different concentrations of suramin (0.05, 0.1, 0.2, 0.4g/L) lonely and combined with 0.2g/L dexamethasone for 4 days. The inhibition ratio of RPE cells was measured by tetrazolium (MTT) colorimetric assay. 0.2g/L suramin and 0.2g/L dexamethasone were added to RPE cells respectively, flow cytometry (FCM) analysis was used to examine RPE cells cycles. The ultrastructure of cells treated with 0.2g/L suramin, 0.2g/L suramin combined with 0.2g/L dexamethasone and 0.4g/L suramin were observed by transmission electronic microscopy (TEM).
• **RESULTS:** Suramin could inhibit the proliferation of RPE cells in a dose-dependent manner. The inhibition ratios of RPE cells treated with suramin combined with 0.2g/L dexamethasone (42.3%, 52.1%, 65.6%, 78.8%) were much higher than those treated with suramin (16.0%, 27.3%, 40.5%, 64.1%). FCM revealed that the cells were blocked in G₂/M phase in their cell cycle by suramin ($P < 0.01$) and blocked in G₂/M phase by dexamethasone ($P < 0.01$). The ultrastructure of cells were well at the concentrations of 0.2g/L suramin and 0.2g/L suramin combined with 0.2g/L dexamethasone, but at the

concentration of 0.4g/L, significant reduction of microvilli and crenulation of cell nucleus were observed.
CONCLUSION: Suramin combined with dexamethasone can effectively inhibit RPE cells growth *in vitro*.
KEYWORDS: retinal pigment epithelium; suramin; dexamethasone

Lin L, Wu YZ. Effects of suramin combined with dexamethasone on proliferation of cultured retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(11):2080-2082

摘要

目的: 探讨苏拉明(suramin, Sur)联合地塞米松(dexamethasone, Dex)对体外培养的猪视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞增殖的影响。
方法: 选择0.05, 0.1, 0.2, 0.4g/L Sur单独作用及联合0.2g/L Dex作用于RPE细胞4d, MTT比色法检测对RPE细胞增殖的影响; 0.2g/L Sur和0.2g/L Dex分别作用于RPE细胞, 流式细胞术检测细胞周期变化; Sur浓度为0.2g/L, 0.4g/L及0.2g/L Sur联合0.2g/L Dex时, 透射电镜观察细胞超微结构情况。
结果: MTT比色法检测表明各浓度Sur对RPE细胞有抑制作用($P < 0.05$), 呈剂量效应关系; 0.2g/L Dex与各浓度Sur联合应用对RPE细胞的抑制率由单独应用Sur的16.0%, 27.3%, 40.5%, 64.1%增至42.3%, 52.1%, 65.6%, 78.8%。流式细胞检测提示Sur将细胞阻滞于G₂/M期($P < 0.01$); Dex将细胞阻滞于S期($P < 0.01$)。透射电镜结果显示, Sur浓度为0.2g/L时, 单独应用及联合0.2g/L Dex应用, RPE细胞结构无明显变化, 而Sur 0.4g/L时, 细胞表面微绒毛减少, 细胞核皱缩。
结论: Sur联合Dex能有效抑制体外培养的RPE细胞增殖。
关键词: 视网膜色素上皮; 苏拉明; 地塞米松
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.11.012

林琳, 吴雅臻. 苏拉明联合地塞米松对体外培养的视网膜色素上皮细胞增殖的影响. 国际眼科杂志 2010;10(11):2080-2082

0 引言

增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)作为视网膜脱离最严重的并发症, 其主要的病理变化是眼内细胞的过度增生, 以及形成可收缩的膜。研究表明多种生长因子与RPE细胞表面受体结合, 启动细胞增殖和迁移, 在PVR形成过程中起重要作用。因为生长因子抑制剂苏拉明(suramin, Sur), 对体外培养的RPE细胞有增殖抑制作用, 因此已成为目前药物防治PVR研究热点^[1], 但对于联合用药的研究尚不多。我们在研究Sur单

独作用 RPE 细胞同时,将 Sur 与常用抗增殖药物地塞米松 (dexamethasone, Dex) 联合用药,探讨联合用药较单独用药提高抑制效果和降低毒性作用的优越性。

1 材料和方法

1.1 材料 刚宰杀 4h 内的猪眼球 (光明屠宰厂) 中提取 RPE 细胞,细胞传至 3 代用于实验,免疫荧光素法检测特异的角蛋白,培养及鉴定方法参照文献 [2]。Sur (Sigma 公司,美国),Dex (天津药业涟水有限公司)。IMDM,胰蛋白酶和胎牛血清 (Gibco,美国),鼠抗人角蛋白 mAb (Dako 公司,美国),MTT (华美公司),二甲基亚砷 (天津大茂公司)。酶联检测仪 Bio-Rad Model (日本),流式细胞仪 Anscan (美国),倒置相差显微镜 37X-BZ (上海光学仪器六厂),JEM-1200EX 型透射电子显微镜 (日本)。

1.2 方法 原代猪 RPE 细胞为扁平不规则多角形,胞质内富含黑色素颗粒。随传代次数增加,胞质内黑色素逐渐减少,细胞变为梭形或不规则形。细胞角蛋白进行免疫荧光素染色以检测特异的角蛋白,胞质呈棕黄色,证明培养的细胞为 RPE 细胞。

1.2.1 抗细胞增殖作用 将实验分为对照组、Sur 组和 Sur 联合 Dex 组。将传至第 3 代的 RPE 细胞接种于 96 孔板,每孔 5000 个细胞 (100 μ L),24h 贴壁后,换培养液,对照组不加药物;Sur 组分别加入 0.05,0.1,0.2,0.4g/L Sur;联合用药组分别加入 0.05,0.1,0.2,0.4g/L Sur 与 0.2g/L Dex 的联合药物。每浓度设 6 个复孔,置 37 $^{\circ}$ C,50mL/L CO₂ 孵箱培养 4d 后,每孔分别加入 5g/L MTT 20 μ L,继续培养 4h 后,各孔加入二甲基亚砷 150 μ L,震荡并静置 10min,置于酶标仪测试,波长 490nm 处读吸光度 A 值。重复测 3 次,取平均值作记录,并计算抑制率。药物抑制细胞作用按公式:细胞生长抑制率 = (对照组 A 值 - 用药组 A 值) / 对照组 A 值 \times 100%。以上实验同样条件下重复 2 次。

1.2.2 RPE 细胞周期的检测 将传至第 3 代的 RPE 细胞消化后,分装入 9 个培养瓶,24h 贴壁后,换培养液,3 瓶分别加入含 0.2g/L Sur 的培养液,3 瓶分别加入含 0.2g/L Dex 的培养液,其余 3 瓶以不含药物的培养液作对照。分别在培养 4d 将细胞消化,PBS 冲洗,无水乙醇固定,Triton-100 震荡,RNA 酶水浴,碘化丙啶染色后过滤,置于流式细胞仪进行检测。

1.2.3 细胞形态观察 将传至第 3 代的 RPE 细胞消化后分装入 8 个培养瓶,24h 贴壁后,弃去原培养液,分为 4 组,即 0.2g/L Sur 组、0.4g/L Sur 组、0.2g/L Sur 和 0.2g/L Dex 联合药物组及不含药物的对照组。药物作用 4d,消化收集细胞,细胞离心后,25g/L 戊二醛前固定,10g/L 锇酸后固定,乙醇系列脱水,Epon812 环氧树脂包埋,制作超薄切片,醋酸双氧铀及柠檬铅双重染色,JEM-1200EX 型透射电镜观察和照相。

统计学分析:使用 SPSS 11.0 统计软件,实验组与对照组采用 Dunnett 检验方法 (q 检验) 对数据进行处理, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 RPE 细胞的生长 各浓度 Sur 对 RPE 细胞作用 4d 可以产生明显抑制作用 ($P < 0.05$),随浓度增加抑制增强 (表 1),各浓度 Sur 与 0.2g/L Dex 联合应用对细胞有明显抑制作用 ($P < 0.01$),抑制率均高于单独应用 Sur 组 (表 1)。

表 1 RPE 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

苏拉明 (g/L)	A	I (%)
0.05	0.274 \pm 0.018 ^a	16.0
0.1	0.237 \pm 0.026 ^b	27.3
0.2	0.194 \pm 0.030 ^b	40.5
0.4	0.117 \pm 0.014 ^b	64.1
0.05 + 0.2Dex	0.188 \pm 0.012 ^b	42.3
0.1 + 0.2Dex	0.156 \pm 0.023 ^b	52.1
0.2 + 0.2Dex	0.112 \pm 0.015 ^b	65.6
0.4 + 0.2Dex	0.069 \pm 0.030 ^b	78.8
对照组	0.326 \pm 0.031	

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表 2 Sur, Dex 对 RPE 细胞增殖周期的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0.2g/L Sur	80.54 \pm 3.88	9.68 \pm 3.94 ^b	9.78 \pm 2.23 ^b
0.2g/L Dex	81.90 \pm 1.47	15.84 \pm 0.82	2.26 \pm 1.96
对照组	87.46 \pm 2.92	9.05 \pm 2.39	3.49 \pm 1.83

^b $P < 0.01$ vs 0.2g/L Dex。

2.2 RPE 细胞周期 实验组与对照组相比,细胞各时相比例发生变化。Sur 组 G₂/M 期细胞增加 ($P < 0.01$),说明 Sur 将细胞阻抑于 G₂/M 期;Dex 组 S 期细胞增加 ($P < 0.01$),说明 Dex 将细胞阻抑于 S 期 (表 2)。

2.3 细胞形态 光镜下对照组细胞呈梭形或不规则多角形,用药组均可见细胞数有减少,且随着药物浓度增加,细胞数减少明显。大多数用药组与对照组无明显不同,但 0.4g/L Sur 单独作用及与 Dex 联合应用时,细胞出现折光性差、细胞变形、胞膜粗糙、胞质皱缩、内部结构不清,偶见细胞变圆、飘浮。透射电镜观察对照组猪 RPE 细胞呈圆形或椭圆形,细胞周围可见大量微绒毛,胞质内线粒体、内质网及高尔基体等细胞器丰富,偶见黑色素颗粒,细胞核内可见 1~3 个核仁,染色较深的小块异染色质主要分布于核膜内侧及核仁周围,常染色质位于核中央,染色浅 (图 1A)。0.2g/L Sur 组和 0.2g/L Sur, 0.2g/L Dex 联合组,细胞结构无明显变化 (图 1B);Sur 0.4g/L 组呈现为细胞表面微绒毛减少,胞膜完整,细胞质和细胞核皱缩,胞核内染色质边缘聚集 (图 1C)。

3 讨论

PVR 的启动和发展表现为过渡的创伤愈合过程,其中包括血-视网膜屏障的破坏、炎症反应、细胞增生移行和分泌细胞外基质、瘢痕收缩等。RPE 细胞自视网膜裂孔进入玻璃体,而血-视网膜屏障的破坏则导致纤维连接蛋白 (FN) 和 PDGF 等血清成分侵入玻璃体,加速 RPE 细胞的移行和增殖。同时 RPE 细胞能分泌转化生长因子 (TGF- β),后者又进一步刺激细胞移行和转化成为成纤维细胞,它们产生趋化因子和促细胞分裂因子,能诱发细胞增生和游走,成纤维细胞分泌胶原,RPE 细胞通过 FN 与胶原结合,随之出现 PVR 胶原收缩。Sur 是一种多磺酸萘醌盐,1970 年代被用于治疗肿瘤和 AIDS。其药物作用机制是抑制生长因子诱导的钙离子内流和抑制蛋白激酶 C 的作用,抑制生长因子与受体结合,抑制其诱导的生物活性,减少生长因子的表达,并能干扰对细胞增殖起关键作用的生长因子的自分泌和旁分泌,进而阻止多种生长因子刺激的细胞增殖^[3]。Sur 对 RPE 细胞的增殖抑制作用,有以下几种原因:Sur 抑制血清中的生长因子与细胞表面

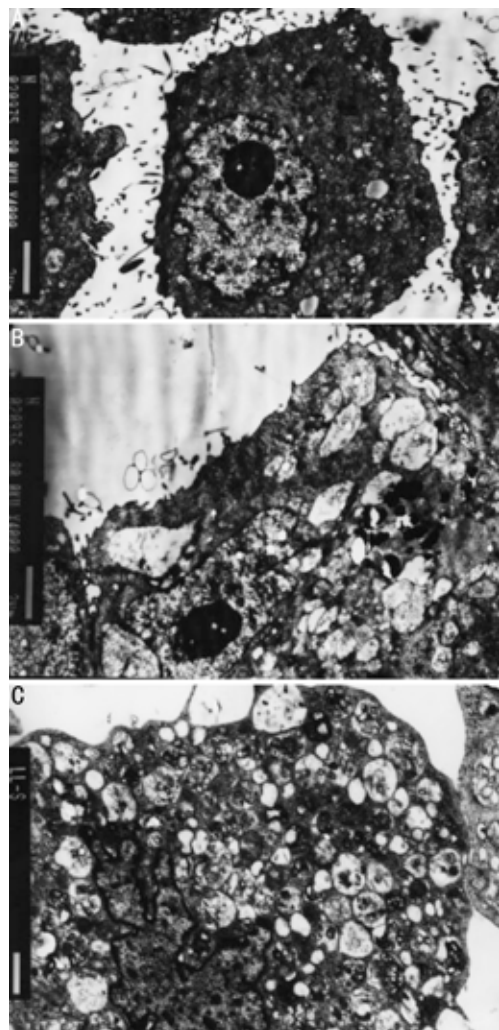


图1 RPE细胞超微结构变化(TEM×4000) A:对照组;B: Sur联合Dex;C:Sur。

受体的结合,抑制这些因子的效应,也降低了因子间的协同作用;阻碍RPE细胞自分泌和旁分泌作用;抑制了对细胞有促进作用的酶类的活性效应,阻断了相关的信号传导途径。Dex属类固醇药物,可抑制细胞DNA、RNA和蛋白质的合成;同时可以改变细胞膜的通透性,抑制其有丝分裂、细胞增殖及其迁移过程;另外还可以抑制免疫反应,减少血管炎性渗出,如蛋白等血清成份,从而减轻对成纤维细胞和RPE细胞的趋化作用,以达到防治PVR的目的。Dex可抑制IL-1 β 诱导的RPE细胞分泌单核细胞趋化蛋白(MCP-1)和IL-8,下调两者mRNA的表达。由于Dex的强大抗炎及对细胞增殖的抑制作用,它已被广泛应用于玻璃体手术的辅助治疗。

在探索抗PVR药物过程中,学者们一直在寻求高效低毒的抗细胞增殖药物。以往研究表明联合用药取得较

满意效果,Tung等^[4]发现5-FU与 $\geq 0.2\text{g/L}$ Dex联合应用时,对体外培养的RPE细胞增殖有协同抑制作用,因此我们选用 0.2g/L Dex与各浓度Sur联合应用。结果显示,联合用药组抑制率均高于单独应用Sur组, 0.2g/L Dex和 0.2g/L Sur联合用药对细胞抑制率($I=65.6\%$),与单独应用 0.4g/L Sur对细胞抑制率($I=64.1\%$)相近,表明低剂量Sur与Dex联用,即可达到单独应用较高剂量Sur的效果,提示两种药物对于抑制RPE细胞增殖,具有良好的协同作用,考虑原因可能是由于Sur和Dex分别抑制了RPE细胞的G2/M期(DNA合成后期、有丝分裂期)和S期(DNA合成期)。由于以往研究许多抗PVR药物因毒性太大而在临床应用上受到局限,因此我们比较了联合用药与Sur单独用药对RPE细胞的毒性作用。光镜和透射电镜下观察细胞形态结构, Sur浓度为 0.4g/L 时,细胞出现了一系列异常变化;而与之抑制作用相当的 0.2g/L Sur, 0.2g/L Dex联合用药组,与对照组相比,形态及超微结构则无明显不同,提示联合用药,可能对减低药物对细胞的毒性有一定作用。细胞死亡可分为坏死和凋亡两种。前者是严重损伤刺激造成的一种病理变化,后者是由来自细胞本身或细胞外的死亡信号触发的一个级联式基因表达的结果。坏死和凋亡具有完全不同的形态特征,发生坏死时,细胞肿大、胞质和胞核溶解;胞内物质溢出,导致周围组织发生炎症。细胞凋亡则表现为细胞皱缩、染色质凝集、片段化,最终形成凋亡小体,不伴炎症反应。细胞膜完整与否是细胞凋亡和细胞死亡的主要区别点^[5]。而在本实验中,透射电镜结果显示,当Sur浓度为 0.4g/L 时,细胞表面微绒毛减少,胞膜完整,细胞浆和细胞核皱缩,胞核内染色质边缘聚集,表现与凋亡的早期征象相似,至于Sur是否能诱导RPE细胞凋亡,还有待进一步的实验研究证实。

总之, Sur联合Dex作用于体外培养的猪RPE细胞,不仅有效地增强了Sur抑制细胞增殖的作用,而且,一定程度上也降低了单独应用较高浓度Sur带来的细胞毒性,因此,相信联合用药,将在防治PVR的进一步动物实验和临床研究中得到更广泛的应用。

参考文献

- 1 崔志利,康军,高丹宇,等. 苏拉明对RPE移行和增殖抑制作用的对照研究. 国际眼科杂志 2008;8(8):1568-1569
- 2 林琳,吴雅臻. 猪视网膜色素上皮细胞的体外培养及鉴定. 中国医师杂志 2009;1(2):202-204
- 3 Abdiu A, Larsson SE, Wasteson A, et al. Suramin blocks growth-stimulatory effects of platelet-derived growth factor on malignant fibrous histiocytomas *in vitro*. *Cancer Lett* 1999;146(2):189-194
- 4 Tung IC, Wu WC, Kao YH, et al. The effect of combined 5-fluorouracil and dexamethasone on cultured human retinal pigment epithelial cells. *Kaohsiung J Med Sci* 2001;17(10):524-529
- 5 Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;45(3):528-537