

盐酸奥布卡因对人角膜内皮细胞影响作用的实验研究

樊廷俊, 温茜, 于苗苗, 葛源, 苗莹, 王德平

基金项目: 国家高技术研究发展 863 计划 (No. 2001AA625050)

作者单位: (266003) 中国山东省青岛市, 中国海洋大学角膜组织工程重点实验室

作者简介: 樊廷俊, 男, 理学博士, 教授, 中国海洋大学海洋生命学院副院长, 国家生命科学与技术人才培养基地主任, 国家细胞生物学教学团队带头人, 在国际上首次建立了非转染的人角膜内皮、基质和上皮细胞系, 在体外重建出结构和功能与在体角膜组织类似的组织工程人角膜内皮、上皮和基质等, 研究方向: 动物细胞工程与角膜组织工程。

通讯作者: 樊廷俊. tjfan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2012-03-27 修回日期: 2012-06-29

Experimental studies on the effect of oxybuprocaine hydrochloride on human corneal endothelial cells

Ting-Jun Fan, Qian Wen, Miao-Miao Yu, Yuan Ge, Ying Miao, De-Ping Wang

Foundation item: National High Technology Research and Development Program ("863" Program) of China (No. 2001AA625050) Key Laboratory for Corneal Tissue Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Ting-Jun Fan. Key Laboratory for Corneal Tissue Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tjfan@ouc.edu.cn

Received: 2012-03-27 Accepted: 2012-06-29

Abstract

• **AIM:** To examine the effect of oxybuprocaine hydrochloride (OBPC-HCl) on *in vitro* cultured human corneal endothelial (HCE) cells and provide foundations for clinical safety use of OBPC-HCl.

• **METHODS:** After treated with OBPC-HCl at different concentrations, the growth situation and morphology of *in vitro* cultured HCE cells were checked under an inverted light microscope, membrane permeability was detected by acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double-fluorescent staining. DNA fragmentations and ultrastructure of HCE cells were observed by DNA agarose gel electrophoresis and transmission electron microscopy (TEM), respectively.

• **RESULTS:** *In vitro* cultured HCE cells treated with OBPC-HCl at a concentration between 62.5mg/L and 4g/L showed typical characteristics of apoptosis, including cell shrinkage, intercellular vacuolation, membrane permeability increasing, chromatin condensation, apoptotic body appearance and DNA fragmentation. The apoptosis-inducing effect of OBPC-HCl was in dose- and time-dependent manners. The greatest apoptosis-inducing

effect of OBPC-HCl on HCE cells was found at the clinic concentration of 4g/L, and the apoptotic rate of HCE cells reached 100% after treated for 1 hour.

• **CONCLUSION:** OBPC-HCl at a concentration of 62.5mg/L-4g/L has an obvious apoptosis-inducing effect on HCE cells, and has huge toxic side effects on HCE cells during its clinic ophthalmic usage.

• **KEYWORDS:** human corneal endothelial cells; oxybuprocaine hydrochloride; apoptosis; DNA fragmentation; apoptotic body

Citation: Fan TJ, Wen Q, Yu MM, *et al.* Experimental studies on the effect of oxybuprocaine hydrochloride on human corneal endothelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(8):1442-1446

摘要

目的: 揭示眼科局部麻醉剂盐酸奥布卡因 (oxybuprocaine hydrochloride, OBPC-HCl) 对体外培养人角膜内皮 (HCE) 细胞的影响作用, 为眼科临床安全用药提供实验依据。

方法: 用不同浓度 OBPC-HCl 处理体外培养的 HCE 细胞, 在倒置显微镜下观察细胞的生长和形态变化, 用吖啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 荧光双染色法检测质膜的通透性, 用琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 的断片化, 用透射电镜检测细胞的超微结构。

结果: OBPC-HCl 在 62.5mg/L ~ 4g/L 的浓度范围内均能不同程度地引起 HCE 细胞出现细胞皱缩、胞内空泡化、质膜通透性增大、染色质凝缩、凋亡小体和 DNA 断片化等典型的细胞凋亡特征, 并具有浓度和时间依赖性, 临床使用浓度 4g/L OBPC-HCl 对 HCE 细胞的凋亡诱导作用最大, 处理 1h 后 HCE 细胞的凋亡率已高达 100%。

结论: OBPC-HCl 在 62.5mg/L ~ 4g/L 的浓度范围内能显著诱导 HCE 细胞凋亡, 在眼科临床应用中 HCE 细胞的毒副作用极大。

关键词: 人角膜内皮细胞; 盐酸奥布卡因; 细胞凋亡; DNA 断片化; 凋亡小体

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.08.05

引用: 樊廷俊, 温茜, 于苗苗, 等. 盐酸奥布卡因对人角膜内皮细胞影响作用的实验研究. 国际眼科杂志 2012;12(8):1442-1446

0 引言

随着眼科手术的发展, 盐酸奥布卡因 (oxybuprocaine hydrochloride, OBPC-HCl) 和利多卡因 (lidocaine) 等表面麻醉剂的应用也越来越广泛^[1]。OBPC-HCl 是一种作用迅速、扩散面广且组织穿透力较强的新型表面麻醉剂, 被广泛应用于各种临床眼科手术的术前麻醉^[2,3]。目前的研究结果表明, 利多卡因对兔角膜内皮细胞具有一定的毒性作用^[4-9], OBPC-HCl 具有瞳孔散大等毒副作用^[10], 但关于

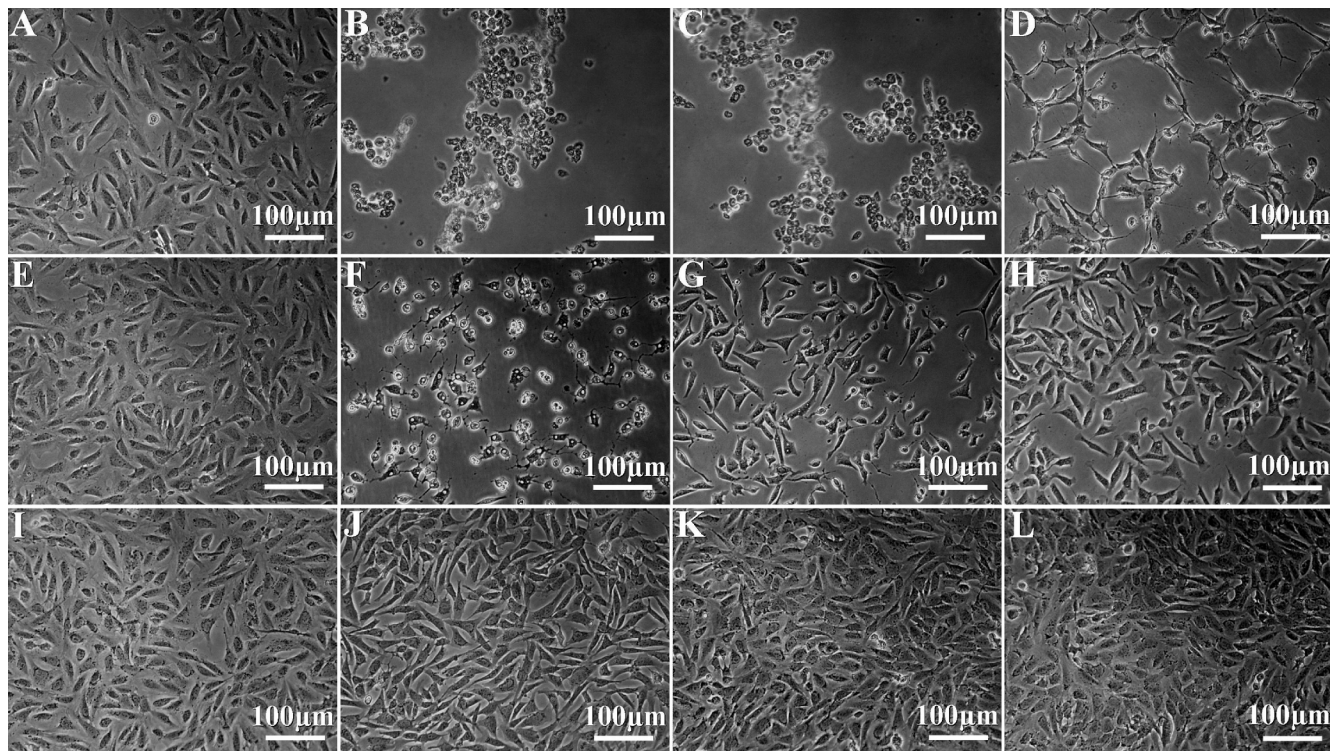


图1 盐酸奥布卡因处理 HCE 细胞的光镜观察 A:空白对照,2h;B:4g/L,2h;C:2g/L,2h;D:1g/L,2h;E:空白对照,12h;F:0.5g/L,12h;G:0.25g/L,12h;H:0.125g/L,12h;I:空白对照,24h;J:62.5mg/L,24h;K:31.25mg/L,24h;L:15.625mg/L,24h。

表面麻醉剂尤其是 OBPC-HCl 对人角膜内皮 (HCE) 细胞的影响作用至今仍未见报道。近年来,非转染 HCE 组织细胞系的建立使体外研究眼科表面麻醉剂对 HCE 细胞的影响作用成为可能^[1]。为了揭示 OBPC-HCl 对 HCE 细胞的影响作用,我们拟以非转染 HCE 细胞系 (utHCEC01)^[1] 为体外实验体系,研究不同浓度 OBPC-HCl 对 HCE 细胞的影响作用,旨在查清 OBPC-HCl 对 HCE 细胞的毒性作用,为临床眼科 OBPC-HCl 的安全用药提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 非转染人角膜内皮细胞系 (utHCEC01) 为本实验室自行建立^[1],采用含有 100mL/L 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/F₁₂ 培养液 (100mL/L FBS-DMEM/F₁₂) 进行体外培养与扩增;盐酸奥布卡因 (oxybuprocaine hydrochloride, OBPC-HCl) 购自 Sigma 公司。

1.2 方法 将 HCE 细胞接种至 24 孔培养板,待细胞增殖至孔底面积 80% 后,分别加入含有终浓度 15.625mg/L ~ 4g/L OBPC-HCl 的 100mL/L FBS-DMEM/F₁₂ 培养液,置 37°C,50mL/L CO₂ 培养箱培养,跟踪观察对照组和各浓度组细胞生长状况及形态学变化并拍照。按上述方法接种培养 HCE 细胞和加药,用上述相同培养液和培养条件继续培养,于不同时间采用胰酶消化法分别收获细胞悬液,1500r/min 离心 10min 后用 0.1mL 无血清 DMEM/F₁₂ 培养液充分悬浮细胞沉淀,加入 4μL 吖啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 染液 (100mg/L AO 溶液:100mg/L EB 溶液=1:1) 充分混匀,于室温下染色 1min 后滴于载玻片上,加盖片后置荧光显微镜下观察并拍照;细胞核呈红色和橙红色荧光者计为凋亡细胞,而呈亮绿色荧光者计为非凋亡的正常细胞,每组细胞随机选择至少 6 个视野进行细胞计数 (不少于 300 个细胞),按“细胞凋亡率=凋亡细胞数/(正常细胞数+凋亡细胞数)×100%”公式计算细胞凋亡率。按上述

方法接种培养 HCE 细胞和加药,用上述相同培养液和培养条件继续培养,于不同时间后采用胰酶消化法分别收获细胞悬液,1500r/min 离心 10min 收集细胞沉淀,按照 DNA 提取试剂盒说明提取细胞 DNA,用 10g/L 琼脂糖凝胶对 DNA 样品进行电泳 (4h,20min),将电泳凝胶置 0.5mg/L EB 中染色 10min,置紫外检测仪下观察并照相。按上述方法于 25cm² 培养瓶中接种培养 HCE 细胞和加药,用上述相同培养液和培养条件继续培养 16h,用细胞刮刀法分别收获细胞,用 40g/L 戊二醛-蔗糖添加二甲胂缓冲液进行固定,按常规方法进行固定、包埋、超薄切片和染色处理,置 H-700 透射电镜观察并照相。上述实验均以不加 OBPC-HCl 培养孔中的 HCE 细胞为空白对照,每个浓度设 3 个平行样。

统计学分析:并采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析,以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有检验均采用双侧 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCE 细胞的光镜观察 倒置显微镜观察结果显示,0.125 ~ 4g/L OBPC-HCl 处理组的 HCE 细胞,细胞停止分裂与生长,出现了不同程度的细胞皱缩、空泡化和变圆脱落等现象,并具有浓度和时间依赖性,随着浓度的提高和时间的延长上述形态变化的程度逐步增大,细胞最终死亡。其中,1 ~ 4g/L OBPC-HCl 对 HCE 细胞的毒性作用极大,处理 2h 后细胞形态的变化程度与空白对照组相比十分剧烈 (图 1A ~ D),4h 后绝大部分细胞死亡;0.125 ~ 0.5g/L OBPC-HCl 对 HCE 细胞的毒性作用次之,处理 12 ~ 24h 后大部分细胞死亡 (图 1E ~ H);62.5mg/L OBPC-HCl 对 HCE 细胞的毒性作用较弱,虽出现了细胞皱缩、空泡化和变圆脱落等形态变化,但处理 24h 后仅有少量细胞死亡 (图 1J);而 31.25mg/L 和 15.625mg/L OBPC-HCl 对 HCE 细胞几乎没有毒性作用,处理 24h 后的细胞数量及其形态

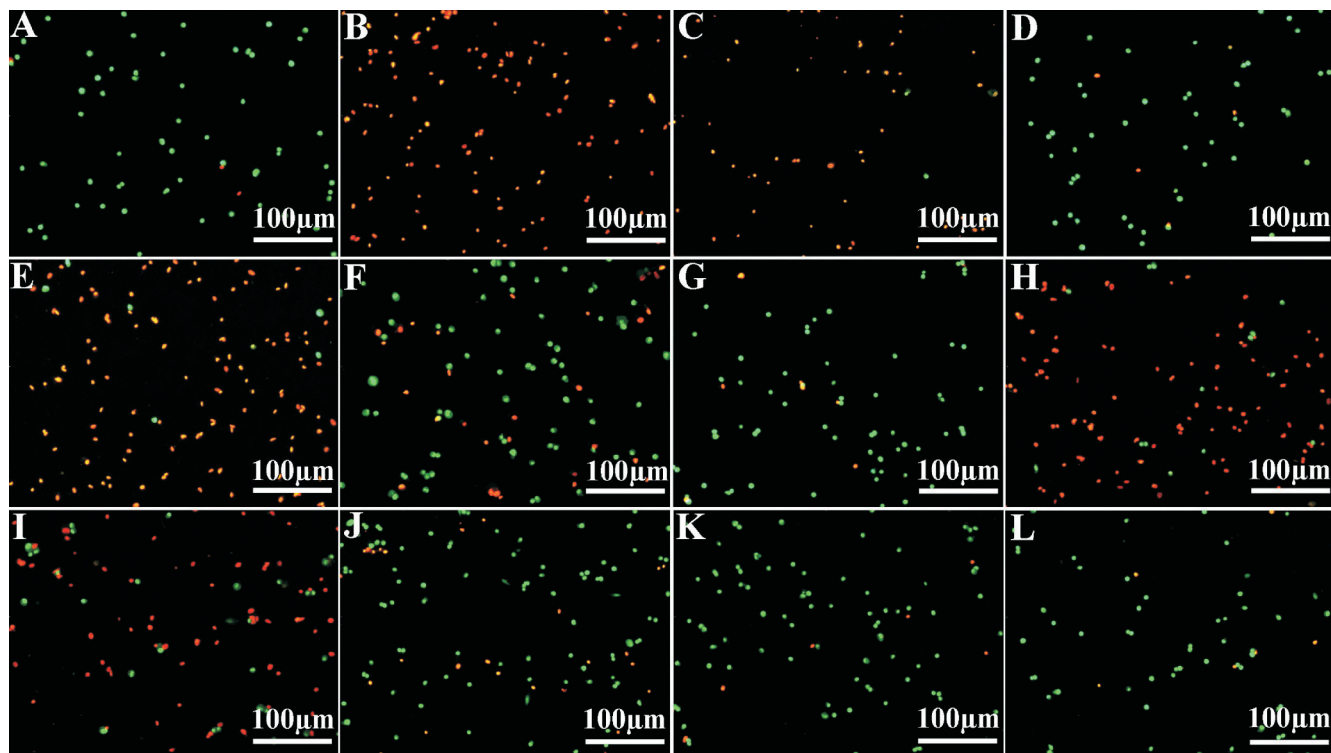


图2 盐酸奥布卡因处理 HCE 细胞的 AO/EB 荧光双染色照片 A:空白对照,1h;B:4g/L,1h;C:2g/L,1h;D:空白对照,2h;E:1g/L,2h;F:0.5g/L,2h;G:空白对照,16h;H:0.25g/L,16h;I:0.125g/L,16h;J:62.5mg/L,16h;K:31.25mg/L,16h;L:15.625mg/L,16h。

与空白对照组相似(图 1I, K, L)。上述光镜观察显示,62.5mg/L~4g/L OBPC-HCl 对 HCE 细胞具有显著的毒性作用。

2.2 AO/EB 荧光双染色 荧光双染色观察结果显示,OBPC-HCl 在 62.5mg/L~4g/L 的浓度范围内均可引起 HCE 细胞质膜通透性发生不同程度的提高,不同数量 AO 的渗入使细胞核呈现出亮橙色和红色荧光,且质膜通透性的提高具有浓度和时间依赖性,2~4g/L 时最强,62.5mg/L 时次之,15.625~31.25mg/L 时最弱(图 2)。暗示浓度 62.5mg/L~4g/L 的 OBPC-HCl 均能引起 HCE 细胞发生细胞凋亡。

统计和计算结果显示,2~4g/L 的 OBPC-HCl 在 1~2h 能使 HCE 细胞的凋亡率达到 100%,0.125~1g/L 的 OBPC-HCl 在 8~24h 也能使 HCE 细胞的凋亡率先后达到 100%,62.5mg/L 的 OBPC-HCl 处理 8h 的细胞凋亡率最高也只有 25.3%,与空白对照组相比均具有极显著性差异($P<0.01$),而 31.25mg/L 和 15.625mg/L OBPC-HCl 对 HCE 细胞的凋亡诱导作用与空白对照组相比没有显著差异(图 3)。表明 OBPC-HCl 诱导的 HCE 细胞凋亡率具有浓度依赖性,在 0.125~4g/L 的浓度范围内还具有时间依赖性。

2.3 HCE 细胞 DNA 的琼脂糖凝胶电泳 10g/L 琼脂糖凝胶电泳结果显示,0.125~4g/L 的 OBPC-HCl 处理 HCE 细胞的 DNA 均出现了典型的梯状条带(图 4)。表明 OBPC-HCl 能诱导 HCE 细胞发生 DNA 断片化,具有诱导 HCE 细胞凋亡的作用。

2.4 HCE 细胞的透射电镜观察 未加药培养 16h 的 HCE 细胞,其形态和结构正常(图 5A)。对 0.125g/L OBPC-HCl 处理 HCE 细胞的 TEM 观察结果显示,8h 后 HCE 细胞的胞质中出现大的空泡、染色质浓缩并在核内边缘化(图 5B),表现出凋亡早期的形态和结构特征;12h 后 HCE

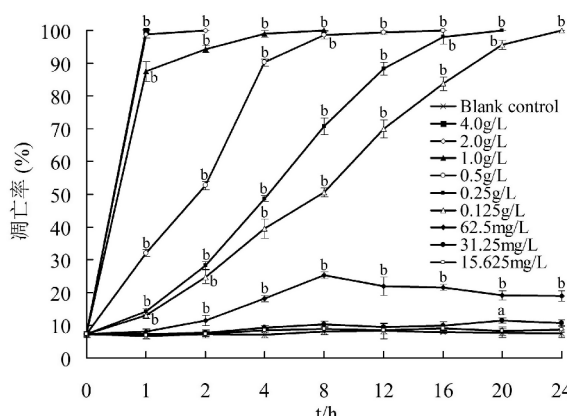


图3 盐酸奥布卡因处理 HCE 细胞的凋亡率 $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ vs 对照组。

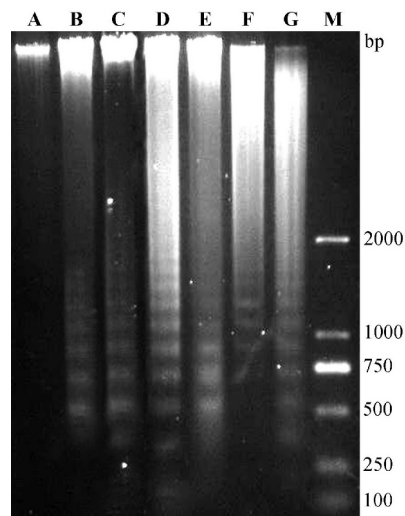


图4 盐酸奥布卡因处理 HCE 细胞的 DNA 电泳图谱 A:空白对照,12h;B:0.125g/L,12h;C:0.25g/L,12h;D:0.5g/L,4h;E:1g/L,1h;F:2g/L,1h;G:4g/L,1h;M:DNA marker。

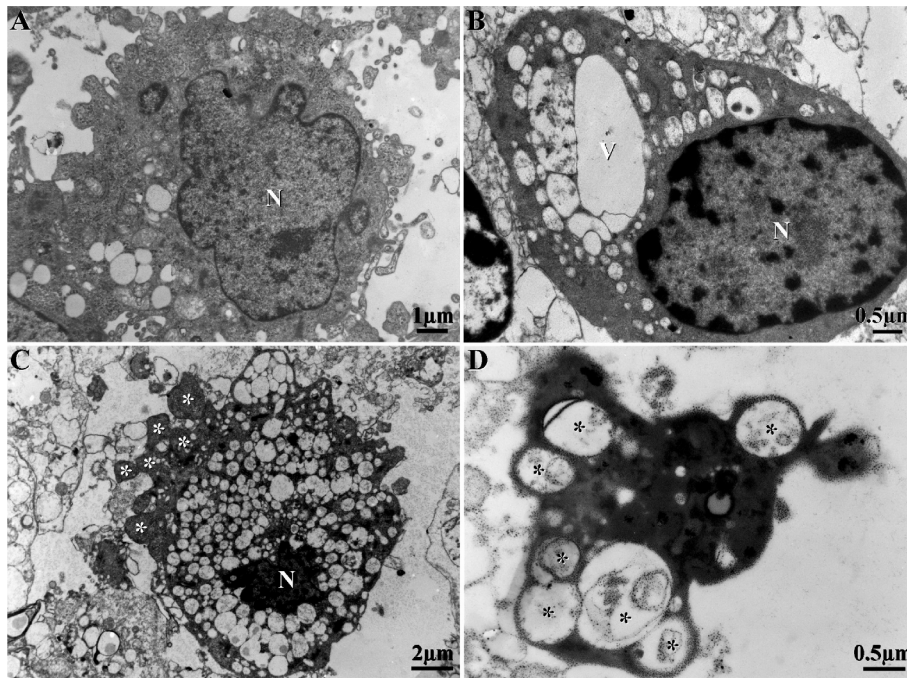


图5 盐酸奥布卡因处理 HCE 细胞的透射电镜照片 A:空白对照,16h;B:0.125g/L,8h; C:0.125g/L,12h;D:0.125g/L,16h;V:空泡;N:细胞核;* :凋亡小体。

细胞的超微结构紊乱、细胞萎缩、胞质浓缩并出现大量空泡、细胞核开始解体并开始形成凋亡小体(图5C),到16h时核被膜破裂、形成许多凋亡小体(图5D),表现出凋亡后期的形态和结构特征。表明 OBPC-HCl 能使 HCE 细胞在形态和结构上出现典型的细胞凋亡特征,确能诱导 HCE 细胞发生凋亡。

3 讨论

正常人角膜内皮由单层 HCE 细胞构成,其完整性对维持角膜的透明性和正常厚度具有不可替代的作用,也是角膜发挥正常生理功能的关键,但极易受到各种理化因素如药物和高眼压等的损伤^[12]。成体 HCE 细胞丧失了分裂和增殖能力,且其细胞密度随着年龄的增长而逐渐降低^[13]。一旦 HCE 细胞受到损伤,就会引起角膜透明度降低,严重者将影响视力^[12]。可见,研究 OBPC-HCl 等眼科表面麻醉剂对 HCE 细胞的影响作用,对于其临床用药安全具有重要的理论指导价值。

目前,OBPC-HCl 的临床使用浓度一般为 4g/L。为了检测 OBPC-HCl 对 HCE 细胞的毒性作用,我们以临床使用浓度 4g/L 为基础对 OBPC-HCl 进行了倍比稀释,并利用本实验室建立的非转染 HCE 细胞系研究了 15.625mg/L ~ 4g/L 的 OBPC-HCl 对 HCE 细胞的毒性作用。光镜观察结果显示,OBPC-HCl 在浓度高于 31.25mg/L 时对 HCE 细胞具有明显的毒性作用,细胞停止分裂与生长,并出现了细胞皱缩、空泡化、最终变圆脱落而死亡的现象,并具有浓度和时间依赖性,临床使用浓度的毒性作用最大。OBPC-HCl 对 HCE 细胞的毒性作用,与其对活体兔角膜内皮细胞的研究报道相似^[9]。上述形态变化与细胞凋亡过程中的形态变化相似,暗示 OBPC-HCl 可能具有诱导 HCE 细胞凋亡的作用。

质膜通透性的提高,是细胞凋亡过程中生理学变化的

显著特征之一^[13,14]。为了验证 OBPC-HCl 对 HCE 细胞的毒性作用是否是通过诱导细胞凋亡来实现的,我们又利用 AO/EB 荧光双染色技术对各处理组 HCE 细胞的质膜通透性进行了研究。发现 OBPC-HCl 在浓度高于 62.5mg/L 时能显著提高 HCE 细胞质膜的通透性($P < 0.05$),并具有浓度和时间依赖性,只有在浓度低于 31.25mg/L 时没有显著的细胞凋亡诱导作用。证明 OBPC-HCl 具有显著的细胞凋亡诱导作用,临床使用浓度的凋亡诱导作用最强,暗示目前 OBPC-HCl 的临床使用剂量对 HCE 细胞具有极大的毒性作用,能显著诱发 HCE 细胞凋亡进而降低单层 HCE 细胞的密度,最终引起角膜透明度的降低甚至致使视力下降。

DNA 断片化是细胞凋亡的标志性特征之一^[15-18]。为了证实 OBPC-HCl 对 HCE 细胞的凋亡诱导作用,我们还利用 10g/L 琼脂糖凝胶电泳对各处理组 HCE 细胞的 DNA 断片化进行了鉴定。发现 0.125 ~ 4g/L 的 OBPC-HCl 处理后,HCE 细胞的 DNA 均出现了典型的梯状条带,即发生 DNA 断片化。从而证实 OBPC-HCl 能诱导 HCE 细胞发生 DNA 断片化,具有显著的 HCE 细胞凋亡诱导作用。

细胞凋亡不同于细胞坏死,它不发生质膜破裂、也不会引起炎症反应,而是形成一个凋亡小体,最终可被周围吞噬细胞清除^[18]。为了进一步证实 OBPC-HCl 诱导 HCE 细胞凋亡的毒性作用,我们还利用 TEM 对 0.125g/L OBPC-HCl 处理 HCE 细胞进行了超微结构鉴定,发现处理后的 HCE 细胞出现了细胞萎缩、胞质浓缩、超微结构紊乱、染色质浓缩、浓缩染色质核内边缘化以及核被膜破裂等凋亡细胞的典型结构特征,而且出现了凋亡小体,进一步证实 OBPC-HCl 确实能诱导 HCE 细胞发生凋亡。

综上所述,OBPC-HCl 在 62.5mg/L ~ 4g/L 的浓度范围内均能强烈诱导体外培养 HCE 细胞发生凋亡,对 HCE

细胞的毒性作用极大,且具有浓度和时间依赖性;首次证实现有临床使用浓度下 OBPC-HCl 对 HCE 细胞具有极大的毒性作用,只有在低于 62.5mg/L(临床使用浓度的 1/64)后才相对安全。因此,在眼科临床手术时应避免使用 OBPC-HCl,更不能以前房注射的方法使用,本文研究结果对于评价 OBPC-HCl 等表面麻醉剂临床使用的毒性作用具有重要价值。

参考文献

- 1 Mathew MR, Webb LA, Hill R. Surgeon experience and patient comfort during clear corneal phacoemulsification under topical local anesthesia. *J Cataract Refract Surg* 2002;28(11):1977-1981
- 2 肖紫云,李红艳,李家璋,等. 盐酸奥布卡因表面麻醉剂在斜视矫正术中的应用. *国际眼科杂志* 2008;8(12):2541-2542
- 3 张光明,麦才铿. 奥布卡因与布比卡因混合液联合角膜接触镜治疗 PRK 术后疼痛. *眼视光学杂志* 2000;2(4):204-206
- 4 赵云娥,余阿勇,王勤美,等. 国产利多卡因对兔角膜内皮细胞影响的实验研究. *眼科研究* 2001;19(1):14-15
- 5 Ma LW, Xu J, Hsu ML, et al. Effect of intracameral anesthetics on rabbit cornea endothelium. *Int J Ophthalmol* 2005;5(5):855-858
- 6 曾波,张晓农,周和政. 表面麻醉联合前房内麻醉对兔眼角膜内皮细胞的影响. *国际眼科杂志* 2006;6(5):1035-1038
- 7 王晓晖,何敏,王万辉,等. 兔眼前房注射利多卡因后角膜内皮细胞的形态改变. *中国药物与临床* 2007;7(9):689-690

- 8 王晓晖,秦向阳,王万辉,等. 0.5g/L 爱尔卡因前房麻醉对家兔角膜内皮细胞的影响. *中国药物与临床* 2007;7(12):932-933
- 9 王晓晖,王万辉,何敏. 0.04% 倍诺喜对角膜内皮细胞影响的实验研究. *临床医学* 2006;15(4):246-247
- 10 胡红莉,尹莉莉,李海波. 滴用盐酸奥布卡因引起一过性瞳孔散大三例. *眼科* 2008;17(1):47
- 11 Fan T, Zhao J, Ma XY, et al. Establishment of a continuous untransfected human corneal endothelial cell line and its biocompatibility to denuded amniotic membrane. *Mol Vis* 2011;17:469-480
- 12 Schierhölter R, Honegger H. Morphology of the corneal endothelium under normal conditions and during regeneration after mechanical injury. *Adv Ophthalmol* 1975;31:34-99
- 13 Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(3):359-389
- 14 Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res* 2010;91(3):326-335
- 15 李凌,樊廷俊,杨秀霞,等. 黄酮对人角膜内皮细胞的影响及其抗氧化作用. *国际眼科杂志* 2008;8(5):881-885
- 16 樊廷俊,李凌,杨秀霞,等. 人角膜内皮细胞氧化损伤及黄酮抗氧化保护作用的机理研究. *国际眼科杂志* 2008;8(8):1536-1541
- 17 Huerta S, Goulet EJ, Huerta-yopez S, et al. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007;139(1):143-156
- 18 韩贻仁. 分子细胞生物学. 第 3 版. 北京:高等教育出版社. 2007:469-471