

# 维拉帕米对体外人晶状体上皮细胞增殖和黏附的抑制作用

李秋实, 刘丹

作者单位:(121001)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介:李秋实,女,在读硕士研究生,研究方向:后发性白内障的防治机制。

通讯作者:刘丹,女,硕士,教授,主任医师,硕士生导师,研究方向:白内障的基础研究. yankeliudan@yahoo.com.cn

收稿日期:2010-10-08 修回日期:2010-12-02

## Inhibitory effect of verapamil on proliferation and adhesion of human lens epithelial cells *in vitro*

Qiu-Shi Li, Dan Liu

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Dan Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. yankeliudan@yahoo.com.cn

Received:2010-10-08 Accepted:2010-12-02

### Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of the calcium channel blocker verapamil (Ver) on the proliferation, apoptosis and adhesion of the human lens epithelial cell (HLEC) *in vitro*.

• **METHODS:** Primary lens epithelial cells were cultured by the tissue explants adherent method. The second generations of lens epithelial cells were treated with Ver, the effect of proliferation and adhesion were examined with MTT. Cell morphological changes were examined by using AO/EB staining. Staining with Annexin V-FITC/PI was used to detect the apoptotic cells. The effect of Ver on HLEC cycle was analyzed by flow cytometer (FCM).

• **RESULTS:** HLEC grew out of the edge of tissue pieces after incubation for 4 to 6 days, they reached confluence after 15 to 20 days. HELC proliferation decreased with the increase of the concentration of Ver. The result of flow cytometer showed that the percentage of HLEC in G<sub>1</sub> phase in drug group (78.1 ± 0.2, 83.2 ± 0.6) compared with control group (72.0 ± 0.9) was increased, HLEC in S phase in drug group (10.2 ± 0.1, 8.5 ± 0.3) decreased in comparison with control group (16.9 ± 0.3, P < 0.05). Morphological observation demonstrated that treatment of HLEC with 40g/L Ver for 48 hours caused the typical morphological characteristics of apoptosis, including nuclear condensation and chromatin margination. The

amount of adhered cells in drug group was 73.2% compared with control group.

• **CONCLUSION:** Ver could alter the cycle of HLEC and effectively inhibit the HLEC proliferation. It could induce apoptosis of HLEC and inhibit the adhesion of HLEC.

• **KEYWORDS:** human lens epithelial cell; proliferation; adhesion; apoptosis; cell cycle

Li QS, Liu D. Inhibitory effect of verapamil on proliferation and adhesion of human lens epithelial cells *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):28-30

### 摘要

**目的:**研究钙离子拮抗剂维拉帕米(verapamil, Ver)对体外培养的人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cell, HLEC)增殖、凋亡和黏附的影响。

**方法:**组织块法培养人晶状体上皮细胞,用 Ver 处理第二代人晶状体上皮细胞。MTT 法观察不同浓度的 Ver 对 HLEC 增殖和黏附的影响, AO/EB 双染法观察细胞形态, Annexin V-FITC/PI 双染法观察细胞凋亡情况, 流式细胞术(FCM)检测 Ver 对 HLEC 周期的影响。

**结果:**组织块贴壁 4~6d 可见 HLEC 从组织块边缘长出, 15~20d 接近融合。随着 Ver 药物浓度的增加, HELC 增殖率减少, 以 72h 最为明显。FCM 检测细胞周期变化时发现, G<sub>1</sub> 期细胞在 10, 40g/L Ver(78.1 ± 0.2, 83.2 ± 0.6) 较正常组(72.0 ± 0.9) 增加(P < 0.05); S 期的细胞在 10, 40g/L Ver(10.2 ± 0.1, 8.5 ± 0.3) 较正常组(16.9 ± 0.3) 明显减少(P < 0.05)。形态学观察发现, HELC 在 40g/L Ver 作用 48h 后发生了一系列形态改变, 包括细胞核固缩、染色质边集等凋亡改变。10, 20, 40, 80g/L 的 Ver 可以诱导 HLEC 发生凋亡, 且随着浓度的升高凋亡率显著升高。用药 24h 后 HELC 的贴壁量为对照组的 73.2%。

**结论:** Ver 能改变细胞周期而抑制 HLEC 增殖、诱导细胞凋亡, 并且抑制 HLEC 的黏附。

**关键词:**人晶状体上皮细胞;增殖;黏附;凋亡;细胞周期

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.010

李秋实, 刘丹. 维拉帕米对体外人晶状体上皮细胞增殖和黏附的抑制作用. 国际眼科杂志 2011;11(1):28-30

### 0 引言

后发性白内障 (posterior capsular opacification, PCO) 是白内障手术后常见并发症, 发生率为 35%, 在儿童 PCO 的发生率几乎为 100%。白内障囊外摘出术后在晶状体赤道部残留的晶状体上皮细胞迁移黏附在后囊膜上增殖, 使后囊膜混浊从而影响视力<sup>[1]</sup>。维拉帕米(verapamil, Ver)

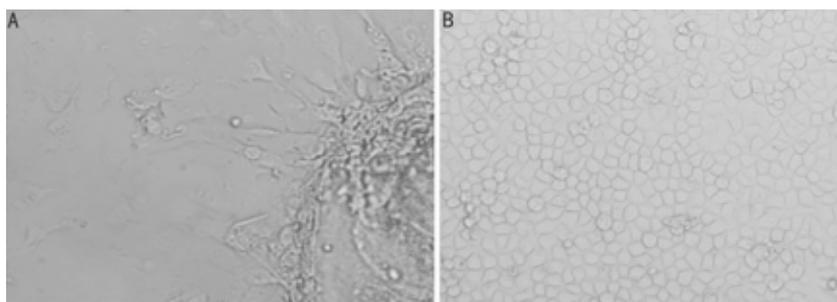


图1 人晶状体上皮细胞原代培养( $\times 200$ ) A:培养4~6d;B:培养15~20d。

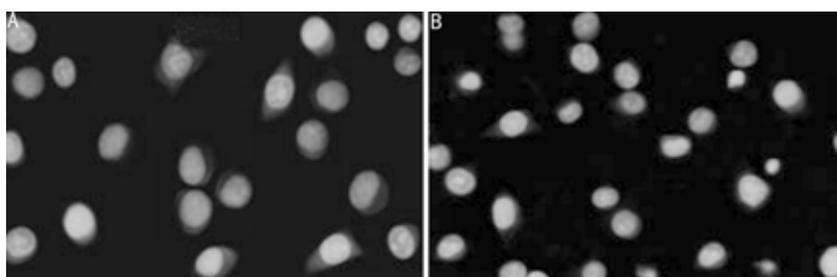


图2 维拉帕米作用下人晶状体上皮细胞形态变化(AO/EB $\times 200$ ) A:正常组;B:40g/L Ver组。

是L型钙通道阻滞剂,是临床上治疗心率失常的常规药物。目前已有实验证明钙离子拮抗剂可以抑制人晶状体上皮细胞增殖<sup>[2]</sup>。我们拟通过实验观察Ver对体外培养的人晶状体上皮细胞增殖、凋亡和黏附的影响,探讨Ver对于防治PCO的可行性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 盐酸维拉帕米注射液(5mg:2mL/支,上海禾丰制药有限公司),DMEM高糖培养基(Gibco),胰蛋白酶(Hyclone),胎牛血清(Hyclone),四甲基偶氮唑蓝(Sigma),吖啶橙(华美生物公司)Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司)。术中取白内障患者前囊膜(辽宁医学院第一附属医院提供),均由同一术者完成,置于含双抗的DMEM培养基中取回。一般不经洗涤,用无齿显微镊子挑起前囊膜,使卷曲面向上平贴于培养板中。置于37℃恒温箱中约5min,待组织块稍干后即可加入培养液。按常规方法培养,每周换液2次,每次更换2/3的培养液量。细胞基本融合时传代<sup>[3]</sup>。大约经过4~6d的潜伏期,细胞开始从组织块周边呈跳跃式长出,细胞逐渐繁殖,形成内密外疏的细胞群落;15~20d基本融合成单层,早期呈多角形或星形,有突起,胞核圆或椭圆形,胞质丰富,胞膜清晰,胞体肥大、透亮(图1)。随着细胞不断分裂增殖。细胞呈铺砌型单层向外生长,突起消失,融合成片的细胞形态趋于一致,较典型的椭圆形和六角形。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞增殖试验** 待细胞基本融合后,胰酶消化,调整细胞浓度以 $5 \times 10^7$ 个/L种于96孔板,每组设5个平行复孔,带细胞基本融合后加入含10,20,40,80g/L Ver的无血清培养液,每个孔的终体积为200 $\mu$ L。培养24,48,72h后弃去培养液,每孔加入5g/L的MTT 20 $\mu$ L,继续培养4h后弃去上清液,每孔加入DMSO 150 $\mu$ L,避光震荡10min,用全自动酶标仪进行比色,波长为490nm,测出每孔吸光值(A)。按照公式计算不同浓度Ver对细胞增殖的影响。抑制率=(阴性对照组A值-实验组A值)/阴性对照组A $\times 100\%$ 。

**1.2.2 细胞形态的观察** 在6孔板中预先置入盖玻片,接种细胞悬液,用浓度为40g/L的Ver干预48h后,与950mL/L

乙醇固定15min,用AO/EB荧光染色30s后照相观察。

**1.2.3 细胞周期的分析** 取对数生长期的HLEC消化后,按 $1 \times 10^9$ /L以1mL体积接种于6孔板中,常规24h培养后实验组加入含10,40g/L Ver的培养液,正常组为DMEM培养液。培养48h后,消化离心收集细胞,以4℃预冷的PBS冲洗2次制成单细胞悬液,加入-20℃预冷的700mL/L乙醇1mL并混匀,于4℃下过夜。检测时PBS洗涤离心去上清液,加入终浓度100mL/L不含DNA酶的RNA酶300 $\mu$ L,37℃水浴消化30min,再加入终浓度为50mL/L的PI染色液300 $\mu$ L,置4℃避光染色30min,上流式细胞仪(FCM)检测,分析软件进行细胞周期的分析。

**1.2.4 细胞凋亡的检测** 收集浓度为10,20,40,80g/L的Ver作用48h的实验组和正常组HLEC。调待测细胞浓度为 $1 \times 10^9$ /L。取1mL细胞,1000r/min,4℃离心10min,弃上清,再加入1mL预冷的PBS同法离心,弃上清,将细胞重悬于Binding Buffer 200 $\mu$ L中,加入Annexin V-FITC 10 $\mu$ L和PI 5 $\mu$ L,轻轻混匀后避光4℃反应30min,最后加入Binding Buffer 300 $\mu$ L,用FCM观察细胞凋亡率。

**1.2.5 细胞黏附实验** 取第2代HLEC以 $5 \times 10^7$ /L接种于24孔板,每组3个复孔,实验组加入IC<sub>50</sub>/10浓度的Ver溶液,24h后将培养液与未贴壁细胞吸掉,加入MTT 100 $\mu$ L,放入培养箱中继续培养4h后吸去上清液,加入DMSO 200 $\mu$ L,震荡均匀后用全自动酶标仪在490nm波长下比色,用A值表示贴壁的细胞量。

统计学分析:所得数据用SPSS 13.0统计软件包进行统计。所测数据行方差分析和q检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 维拉帕米对人晶状体上皮细胞增殖的影响** 随着Ver浓度的增加,细胞增殖率逐渐减少,以72h最为明显(表1)。10,20g/L Ver组随时间增加细胞抑制率增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而40,80g/L Ver组培养48,72h差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 细胞形态的变化** AO/EB染色可见正常细胞体积较大,细胞核呈圆形;40g/L Ver组见细胞体积变小,染色质边集和凋亡小体等特征性凋亡改变(图2)。

2.3 维拉帕米对人晶状体上皮细胞周期的影响 10 和 40g/L Ver 组 G<sub>1</sub>期细胞较正常培养组增加,S 期较正常培养组减少(P<0.05,表2)。

2.4 维拉帕米对人晶状体上皮细胞凋亡率的影响 加入不同浓度的 Ver 可以诱导 HLEC 凋亡,并且凋亡率与浓度呈正相关,随着浓度的增加细胞凋亡率增加,有显著性差异(0.14% ± 1.2%, 7.84% ± 0.98%, 15.87% ± 2.14%, 27.99% ± 1.54%, P<0.05),呈剂量依赖关系。

2.5 维拉帕米对人晶状体上皮细胞黏附的影响 根据细胞增殖抑制曲线计算出不同浓度 Ver 在 24h IC<sub>50</sub> 值为 3680g/L。将浓度为 36g/L 的 Ver 作用于 HLEC,其贴壁量用 MTT 检测的 A 值计算。正常未加药物培养组为 0.712 ± 0.038,实验组为 0.521 ± 0.021,两组比较差异有统计学意义(P<0.05)。用药后 HLEC 的贴壁量为对照组的 73.2%。

### 3 讨论

大多数 PCO 是由于白内障术后晶状体囊袋内残留的或新生的上皮细胞增殖而引起,而后一种细胞增殖引起者更为常见。钙离子是细胞内重要的第二信使,同时也是细胞增生的启动因子,其浓度升高可导致细胞有丝分裂的发生。在晶状体中, Ca<sup>2+</sup> 参与维持细胞正常通透性,调节 HLEC 间隙连接及参与晶状体蛋白质代谢的调节等作用。晶状体内钙的调节可能是通过三磷酸肌醇(PI<sub>3</sub>)、电压依赖性离子通道及 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶等发挥作用<sup>[4]</sup>。李秋明等<sup>[5]</sup>已经证实,Ver 可以降低 HLEC 内钙离子浓度。我们实验证明,Ver 可以抑制 HLEC 增殖并且使细胞停留在 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期,S 期减少。这可能是 Ver 使细胞内钙离子浓度降低导致钙调素(CaM)复合物减少,使细胞分化增殖能力下降。同时 Ver 具有诱导细胞凋亡的作用,大量实验证明,Ver 可通过细胞内途径诱导视网膜色素上皮细胞、人结肠癌细胞等的凋亡<sup>[6,7]</sup>。我们选用 AO/EB 和 FCM 来检测凋亡,形态学观察可见细胞体积固缩变小、染色质边集和凋亡小体等特征性凋亡改变,AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率提示,随着 Ver 浓度增加细胞凋亡率也逐渐增加,呈剂量依赖关系。然而其具体凋亡途径尚不清楚,可能与其抑制钙离子通道、减少钙离子内流从而影响蛋白激酶 C 活性有关,同时由于 HLEC 表达 P-糖蛋白<sup>[8]</sup>,Ver 可以抑制其活性从而影响细胞内环境,也可能是诱导凋亡的机制。

整合素 α<sub>2</sub>, α<sub>3</sub>, α<sub>5</sub>, β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub> 在人晶状体上皮细胞株 SRA01/04 中呈阳性表达,Ver 对其表达具有抑制作用,并随药物浓度的增加而逐渐增强<sup>[9]</sup>。整合素是一类介导细胞之间以及细胞与细胞外基质间的相互作用的黏附分子,通过信号传递转换来影响细胞周期、细胞骨架的重置。白内障人工晶状体植入术后晶状体前后囊膜与人工晶状体接触处有大量的纤维连接蛋白、IV 型胶原和层粘连蛋白等产生,IV 型胶原主要影响细胞的黏附,而纤维粘连蛋白主要影响细胞的迁移。整合素存在于晶状体上皮细胞,并且与层粘连蛋白、IV 胶原和纤维连接蛋白识别结合,调节晶状体上皮细胞的黏附迁移和增殖。本实验证明,Ver 可以降低 HLEC 黏附的机制可能是通过抑制细胞内钙离子内流而使整合素蛋白结构改变,从而影响整合素介导的信号转导作用,进而影响晶状体上皮细胞的黏附。

表 1 维拉帕米对体外人晶状体上皮细胞增殖率的影响

Ver(g/L)	$(\bar{x} \pm s, A)$		
	24h	48h	72h
0	0.727 ± 0.078	0.743 ± 0.120	0.767 ± 0.012
10 <sup>a</sup>	0.711 ± 0.078	0.595 ± 0.020	0.535 ± 0.032
20 <sup>a</sup>	0.705 ± 0.010	0.517 ± 0.032	0.516 ± 0.098
40 <sup>a</sup>	0.699 ± 0.056	0.490 ± 0.034	0.453 ± 0.020
80 <sup>a</sup>	0.564 ± 0.078	0.439 ± 0.032	0.340 ± 0.010

<sup>a</sup>P<0.05 vs0g/L Ver。

表 2 维拉帕米对人晶状体上皮细胞周期的影响  $(\bar{x} \pm s, \%)$

Ver(g/L)	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	S
0	72.0 ± 0.9	10.5 ± 0.3	16.9 ± 0.3
10	78.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	11.8 ± 0.1	10.2 ± 0.1 <sup>a</sup>
40	83.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	8.6 ± 0.3	8.5 ± 0.3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs0g/L Ver。

目前处理 PCO 的最常用的方法是 ND:YAG 激光囊膜切开,但其费用较高,且可发生激光能量损伤人工晶状体,引起人工晶状体偏位,眼压升高,黄斑囊样水肿等严重并发症。有关预防白内障术后 HLEC 增殖的药物,即抑制 HLEC 分裂的研究已有相当长的历史。这些药物大部分属于抗代谢、抗肿瘤药物。其中有代表性的有 5-氟尿嘧啶、高三尖杉酯碱、阿霉素等。以上这些制剂在体外培养的 HLEC 中显示了很强的抑制作用,但这些抗代谢药物的毒副作用较大,尚不能应用于临床。我们实验证实,Ver 可以通过影响 HLEC 细胞周期和诱导其凋亡来影响细胞的增殖,并且可以抑制 HLEC 的黏附,从发病机制上来抑制 PCO 的形成。然而其诱导细胞凋亡的途径及对眼内其他组织的影响和给药方式、浓度需进一步探讨。

### 参考文献

- Bertelmann E, Kojetinsky C. Posterior capsule opacification and anterior capsule opacification. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12(1):35-40
- Meissner A, Noack T. Proliferation of human lens epithelial cells (HLE-B3) is inhibited by blocking of voltage-gated calcium channels. *Plflugers Arch* 2008;457(1):47-59
- 杨培增,陈家祺,葛坚. 眼科学基础与临床. 北京:人民卫生出版社 2006:13-14
- Rhodes JD, Sanderson J. The mechanisms of calcium homeostasis and signalling in the lens. *Exp Eye Res* 2009;88(2):226-234
- 李秋明,陆道炎,王雨天,等. 维拉帕米、肝素、地塞米松抑制后囊混浊的细胞学基础:对晶状体上皮细胞增殖和细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的影响. *眼科研究* 1996;14(5):233-235
- 王朋,洪晶. 维拉帕米体外诱导人视网膜色素上皮细胞的凋亡. *国际眼科杂志* 2006;6(3):603-605
- Zawadzki A, Liu Q, Wang Y, et al. Verapamil inhibits L-type calcium channel mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Dis Colon Rectum* 2008;51(11):1696-1702
- Merriman-Smith BR, Young MA, Jacobs MD, et al. Molecular identification of P-glycoprotein;a role in lens circulation? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(9):3008-3015
- 姚刚,谭少健. 维拉帕米对人晶状体上皮细胞整合素表达的抑制作用. *眼科研究* 2009;27(6):499-501