

# 汉防己甲素体外对正常结膜与翼状胬肉成纤维细胞抑制作用的比较

安美霞<sup>1</sup>, 吴开力<sup>2</sup>, 林少春<sup>2</sup>, 潘竹娟<sup>2</sup>

基金项目: 中国自然科学基金资助项目(No. 30371513); 中国广东省广州市科技计划基金资助项目(No. 2007J1-C0101)

作者单位:<sup>1</sup>(510630)中国广东省广州市, 南方医科大学第三附属医院眼科;<sup>2</sup>(510060)中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心国家重点实验室

作者简介: 安美霞, 博士, 副主任医师, 研究方向: 眼表疾病、白内障和眼外伤。

通讯作者: 安美霞. anmeixia@21cn.com

收稿日期: 2010-12-20 修回日期: 2011-01-27

## Comparison on inhibitory effects of tetradrine hormone *in vitro* on normal conjunctiva and pterygium fibroblasts

Mei-Xia An<sup>1</sup>, Kai-Li Wu<sup>2</sup>, Shao-Chun Lin<sup>2</sup>, Zhu-Juan Pan<sup>2</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 30371513); Guangzhou Municipal Science and Technology Program Fund, China (No. 2007J1-C0101)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Mei-Xia An. Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. anmeixia@21cn.com

Received: 2010-12-20 Accepted: 2011-01-27

## Abstract

• **AIM:** To compare the inhibitory effect of tetradrine (Tet) on fibroblast strains respectively from normal conjunctival and pterygial specimens and provide a new thought in evaluating effect of a drug.

• **METHODS:** Different concentrations of Tet solution were added to the third passage normal human conjunctival fibroblasts (HCF) and human pterygium fibroblasts (HPF). After 1, 3 days in culture, the number of cells was measured by 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazol)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid (MTT).

• **RESULTS:** At 1 day, there was no statistical difference in the number of HPF and HCF in  $4 \times 10^{-5}$  mol/L and  $2 \times 10^{-5}$  mol/L Tet tested groups ( $P > 0.05$ ). The number of HCF was larger than that of HPF in other Tet tested groups ( $P < 0.01$ ). At 3 day, the number of HPF was larger than that of

HCF in  $4 \times 10^{-5}$  mol/L Tet tested group ( $P < 0.01$ ). There was no statistical difference in the number of HPF and HCF in other Tet tested groups ( $P > 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** In view of the increased proliferation of HPF than that of HCF,  $2 \times 10^{-5}$  mol/L Tet and other lower-dose Tet has damage to the normal HCF when they exhibit significant antiproliferative effect on cultured HPF at 3 day.

• **KEYWORDS:** fibroblast; conjunctiva; pterygium; tetradrine

An MX, Wu KL, Lin SC, *et al.* Comparison on inhibitory effects of tetradrine hormone *in vitro* on normal conjunctiva and pterygium fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011; 11 (3): 397-399

## 摘要

**目的:** 观察汉防己甲素 (tetradrine, Tet) 对正常结膜和翼状胬肉成纤维细胞抑制作用的异同。

**方法:** 在相同的培养条件下, 传第 3 代的正常结膜与翼状胬肉成纤维细胞皆加入不同浓度的 Tet, 分别于加药后 1 和 3d 行 MTT 检测细胞的存活率。

**结果:** 用药后 1d,  $4 \times 10^{-5}$  和  $2 \times 10^{-5}$  mol/L Tet 对正常结膜与翼状胬肉成纤维细胞存活率无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 其余各浓度的 Tet 对翼状胬肉成纤维细胞的抑制作用大于正常结膜成纤维细胞, 正常结膜成纤维细胞的存活率大于翼状胬肉成纤维细胞 ( $P < 0.01$ )。用药后 3d,  $4 \times 10^{-5}$  mol/L Tet 组翼状胬肉成纤维细胞的存活率大于正常结膜成纤维细胞 ( $P < 0.01$ ); 其余各浓度的 Tet 对两种成纤维细胞存活率无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

**结论:** 用药后 3d,  $2 \times 10^{-5}$  mol/L 及半数抑制量 ( $10^{-5}$  mol/L) 以下浓度的 Tet 对翼状胬肉成纤维细胞起抑制作用, 而对正常结膜成纤维细胞的影响较小。

**关键词:** 成纤维细胞; 结膜; 翼状胬肉; 汉防己甲素

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 03. 006

安美霞, 吴开力, 林少春, 等. 汉防己甲素体外对正常结膜与翼状胬肉成纤维细胞抑制作用的比较. 国际眼科杂志 2011; 11 (3): 397-399

## 0 引言

临床上常用的抗肿瘤抗增殖药物, 在对病变细胞起作用的同时, 对正常细胞亦造成严重影响, 成为现代医学上的一大难题, 制约了其临床的广泛应用。在寻找抑制翼状胬肉的治疗药物中, 我们的研究已证实, 汉防己甲素 (tetradrine, Tet) 对翼状胬肉成纤维细胞 (HPF) 的增殖有

明显的抑制作用<sup>[1]</sup>,但 HPF 已具备了转化细胞特性,表现出较正常结膜成纤维细胞(HCF)增强的、不一样的生长增殖能力<sup>[2,3]</sup>,其对药物的反应是否与 HCF 相同或更敏感? Tet 对 HPF 起抑制作用的同时,是否会对 HCF 有不一样的影响? 我们观察培养的 HCF 和 HPF 对 Tet 抑制作用的反应异同,以便研究药物治疗作用时注意观察药物对周围组织的影响,为临床药物研究提供新的思路。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** CO<sub>2</sub>培养箱(WTB Binder),超净工作台(苏净集团安泰公司),倒置显微镜(ZEZSS Axiovert200),高速冷冻离心机(德国 Universal 32R),酶联免疫检测仪(Multiskan mk3)。RPMI 1640 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),胰蛋白酶(上海生工生物工程有限公司),Tet(江西诺伊尔药业有限公司),噻唑蓝(MTT, MBCHEM 公司)。初发翼状胬肉组织标本来自医院眼科手术患者,术前无特殊用药史,年龄 40~68(平均 54)岁,病程 5~20a;正常球结膜组织来自医院眼角膜移植的供体眼球(无眼疾),年龄匹配。原代培养、传代培养及组织成纤维细胞的纯化、鉴定用本实验研究小组成熟的培养方法<sup>[2]</sup>。

**1.2 方法** 取传第 3 代的 HPF 与 HCF,分别以 10<sup>8</sup>个/L 的细胞密度接种于 2 块 96 孔板(每板皆含 HPF 与 HCF 两部分,每部分再各分 2 组,一组为药物试验组,一组为对照组),每孔为 200μL。培养 24h 后,弃去原培养液,一 96 孔板中药物实验组加入以无血清(减少比色时对结果的影响)RPMI 1640 培养液配成的终浓度分别为 4 × 10<sup>-5</sup>, 2 × 10<sup>-5</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup>, 0.5 × 10<sup>-5</sup>, 0.25 × 10<sup>-5</sup> mol/L 的 Tet 液,对照组只加无血清 RPMI 1640 培养液,每孔为 200μL,每组 5 个孔,置于 37℃ 50mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中,培养 24h 后,行 MTT 检测。另外 1 个 96 孔板中药物试验组分别加入以含 100mL/L 胎牛血清(以利于细胞的正常生长)的 RPMI 1640 培养液配成的终浓度分别为 4 × 10<sup>-5</sup>, 2 × 10<sup>-5</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup>, 0.5 × 10<sup>-5</sup>, 0.25 × 10<sup>-5</sup> mol/L 的 Tet 液,对照组只加含 100mL/L 血清的 RPMI 1640 培养液,每孔为 200μL,每组 5 个孔,然后置于 37℃ 50mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中,于加药后 3d 行 MTT 检测,于酶联免疫检测仪上选双波长模式(570nm, 630nm)测各孔吸光度 A 值,观察 Tet 对两种成纤维细胞抑制作用的异同,存活率 = 实验组 A 值/对照组 A 值。

统计学分析:采用 SPSS 11.0 统计软件进行,结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用两独立样本 *t* 检验,检验水准取  $\alpha = 0.05$ 。

### 2 结果

用药后 1d, 4 × 10<sup>-5</sup> 和 2 × 10<sup>-5</sup> mol/L Tet 对 HPF 与 HCF 抑制作用无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 其余各浓度的 Tet 有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), Tet 对 HPF 的抑制作用大于 HCF, HCF 的存活率大于 HPF。用药后 3d, 4 × 10<sup>-5</sup> mol/L Tet 浓度组 HPF 的存活率大于 HCF ( $P < 0.01$ ); 其余各浓度的 Tet 对两种成纤维细胞抑制无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

### 3 讨论

HPF 是转化而来的,而且可能是肿瘤前的改变<sup>[3-6]</sup>。由于翼状胬肉的病因中紫外线照射被认为是一个主要的环境因素,因此进一步推断紫外线的照射可使成纤维细胞发生转化,此乃翼状胬肉发展的根本机制。抗肿瘤药物是较早用于翼状胬肉辅助治疗的药物,它们主要是通过抑制

表 1 不同浓度 Tet 作用下 HCF 和 HPF 存活率比较

( $\bar{x} \pm s, \%, n=5$ )			
t/d	Tet/(mol/L)	HCF	HPF
1	0.25 × 10 <sup>-5</sup>	116.4 ± 8.8 <sup>b</sup>	85.9 ± 4.9
	0.5 × 10 <sup>-5</sup>	114.3 ± 9.1 <sup>b</sup>	84.3 ± 15.3
	1 × 10 <sup>-5</sup>	107.5 ± 6.4 <sup>b</sup>	79.9 ± 6.6
	2 × 10 <sup>-5</sup>	86.7 ± 7.9	79.8 ± 19.4
3	4 × 10 <sup>-5</sup>	55.2 ± 6.6	55.8 ± 15.6
	0.25 × 10 <sup>-5</sup>	92.1 ± 2.6	96.9 ± 4.2
	0.5 × 10 <sup>-5</sup>	89.6 ± 3.3	93.9 ± 3.0
	1 × 10 <sup>-5</sup>	32.0 ± 10.8	43.6 ± 2.8
	2 × 10 <sup>-5</sup>	20.9 ± 5.9	25.5 ± 2.9
	4 × 10 <sup>-5</sup>	4.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	6.2 ± 0.3

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vsHPF。

成纤维细胞 DNA 复制,抑制 DNA, RNA 和蛋白质的合成从而达到抑制成纤维细胞增殖的作用。大多数此类药物在对病变细胞起作用的同时,对正常细胞亦造成严重影响,较多且严重的副作用使许多临床医生对之望而却步,严重制约了药物的临床应用和治疗疾病的药物选择。研究表明, Tet 不仅能直接抑制肿瘤生长,还可明显增加放射线对肿瘤细胞的杀伤作用,并且具有逆转耐药、减轻放疗毒副反应的作用,表明 Tet 在抗肿瘤治疗中有着良好的临床应用前景。

我们已进行的研究观察到实验中所用的各浓度组 Tet 对 HPF 的增殖皆有明显的抑制作用,半数抑制量约 10<sup>-5</sup> mol/L<sup>[1]</sup>,且细胞可能通过凋亡等途径死亡。为了对 Tet 的抑制作用作出较全面评价,以便研究药物治疗作用时注意观察药物对周围组织的影响,我们对比观察了 HCF 和 HPF 对 Tet 抑制作用的反应情况,结果显示,用药后 1d,除了 4 × 10<sup>-5</sup>, 2 × 10<sup>-5</sup> mol/L Tet 两个高药物浓度组对 HPF 和 HCF 抑制作用相似外 ( $P > 0.05$ ),其余各浓度的 Tet(半数抑制量 10<sup>-5</sup> mol/L 及以下<sup>[1]</sup>)对翼状胬肉成纤维细胞的抑制作用皆大于正常结膜成纤维细胞,正常结膜成纤维细胞的存活率大于翼状胬肉成纤维细胞 ( $P < 0.01$ , 细胞的存活率大于 100 应是药物的抑制作用小于细胞的生长趋势所致),表明 Tet 对 HPF 起作用的同时,对 HCF 造成的影响较小。我们曾观察新西兰纯系大白兔应用 Tet 滴眼后对其靶器官毒性反应及其损害的可逆性,用药浓度高达 5g/L(4 × 10<sup>-5</sup> mol/L Tet 相当于 24.9mg/L)以下未检测到明显的眼部损害,达 10g/L 时仅有眼部刺激症状,停用 3d 即消失,说明其有很好的安全性。用药后 3d, 4 × 10<sup>-5</sup> mol/L Tet 组 HPF 的存活率大于 HCF,其余各 Tet 浓度组 HPF 与 HCF 存活率无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),结合两种细胞的生长增殖情况(HPF 的生长增殖能力大于 HCF)<sup>[2,3]</sup>,说明 Tet 对 HPF 起作用的同时对 HCF 的影响较小,4 × 10<sup>-5</sup> mol/L Tet 组可能为剩余 HPF 的增殖能力强、生长快所致。Tet 对 HPF 的增殖具有明显的抑制作用,可能不同的作用机制是:使细胞分裂被阻止在 S 期(DNA 合成期),使 S 期向 G<sub>2</sub> 期过渡受阻,可能与细胞通过凋亡途径死亡<sup>[1]</sup>等机制有关。

该实验的结果表明,用药后 3d, 2 × 10<sup>-5</sup> mol/L 及半数抑制量(10<sup>-5</sup> mol/L)以下浓度的 Tet 在对 HPF 起抑制作用

的同时,对 HCF 造成的影响较小,此结果是令人鼓舞的,有较好的开发前景,而其反应作用差异的具体机制需进一步研究。

#### 参考文献

- 1 安美霞,吴开力,林少春. 汉防己甲素抑制翼状胬肉成纤维细胞增殖的研究. 国际眼科杂志 2007;7(4):934-937
- 2 安美霞,吴开力,林少春,等. 正常球结膜与翼状胬肉成纤维细胞生长因子增殖状况的对比观察. 中国实用眼科杂志 2007;25(11):1260-1263
- 3 Chen JK, Tsai RJ, Lin SS. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit transformed cell characteristics. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*

1994;30A(4):243-248

- 4 Nolan TM, DiGirolamo N, Sachdev NH, *et al.* The role of ultraviolet irradiation and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the pathogenesis of pterygium. *Am J Pathol* 2003;162(2):567-574
- 5 Nolan TM, DiGirolamo N, Coroneo MT, *et al.* Proliferative effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on pterygium epithelial cells and fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):110-113
- 6 Maini R, Collison DJ, Maidment JM, *et al.* Pterygial derived fibroblasts express functionally active histamine and epidermal growth factor receptors. *Exp Eye Res* 2002;74(2):237-244

## 《国际眼科杂志》英文版自 2011 年改为双月刊

《国际眼科杂志》英文版 International Journal of Ophthalmology (English edition) 于 2008 年创刊,2010 年 9 月已成功地被 SCIE 正式收录,收录时间从 2008 年第 1 卷第 1 期开始。这是我国惟一被国际最权威检索机构 SCIE 收录的眼科专业学术期刊。值此,我们特别感谢国内外全体编委和广大眼科专家及作者对本刊的宝贵指导和大力支持!

应广大编委和作者及读者的强烈要求,并为加速本刊发展,经主管部门审批,《国际眼科杂志》英文版自 2011 年第 1 期起由季刊改为双月刊,每逢双月 18 日出版,国际标准刊号 ISSN 6172-5123,国内统一刊号 CN 61-1419/R。定价:每期 30 元,全年 180 元。改刊后,我们将继续坚持让中国眼科走向世界,让世界眼科关注中国的办刊宗旨,并为广大作者及读者提供更加尊贵、优质、快捷的服务。IJO 将和国内外眼科专家学者共同努力为促进我国及世界眼科事业的发展做出新的更大的贡献!

欢迎指导! 欢迎投稿! 欢迎订阅!

电 话:029-82245172      029-82210956  
传 真:029-82245172  
邮 箱:IJO.2000@163.com      IJO2000@126.com  
网 址:www.ijo.cn