

# 曲尼司特对体外培养人视网膜色素上皮细胞增殖的影响

余 静, 庞东渤

作者单位: (121000) 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: 余静, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 增殖性视网膜病变。

通讯作者: 庞东渤, 男, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病临床与基础. Pang2000@163.com

收稿日期: 2013-05-20 修回日期: 2013-09-16

## Effects of tranilast on proliferation of cultured human retinal pigment epithelial cells *in vitro*

Jing Yu, Dong-Bo Pang

Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dong-Bo Pang. Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. Pang2000@163.com

Received: 2013-05-20 Accepted: 2013-09-16

### Abstract

• AIM: To investigate the effects of tranilast on proliferation of cultured human retinal pigment epithelial (RPE) cells *in vitro*.

• METHODS: To treat them with different concentrations of tranilast 0 (control group), 12.5, 25, 50, 100mg/L after culturing human retinal pigment epithelial cells (hRPE-19 cell line) 3-5 generations. And then to observe cell morphology under inverted microscope combined with HE staining, identify the cell by keratin CK18. Detecting inhibition rate by MTT colorimetric method after the cells were treated with different concentrations of tranilast for 12h, 24h, 48h. The RPE cells were cultured with different concentrations of tranilast for 24h, then to measure the transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) and platelet-derived growth factor receptor A protein (PDGFR-A) expressing by Western-Blot and immunohistochemical method.

• RESULTS: The cell inhibition rate increased with the increase of concentration at the same time point ( $P < 0.05$ ). It shows a statistically significant difference. TGF- $\beta_1$  protein expression is in cell plasma and PDGFR-A protein in the cell membrane and cytoplasm, the expression of their amount was lowered with the increase of concentration of tranilast ( $P < 0.05$ ). It shows a statistically significant difference.

• CONCLUSION: Tranilast could inhibit RPE proliferation, and it may be connected with the decreased TGF- $\beta_1$  and PDGFR-A protein expression.

• KEYWORDS: tranilast; proliferative vitreoretinopathy; human retinal pigment epithelial

Citation: Yu J, Pang DB. Effects of tranilast on proliferation of cultured human retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(10):1970-1973

### 摘要

目的: 观察曲尼司特对体外培养人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞增殖的影响。

方法: 用不同浓度的曲尼司特 0 (对照组), 12.5, 25, 50, 100mg/L 作用于体外培养的 3~5 代人 RPE 细胞 (RPE-19 细胞株), 在倒置显微镜下, 结合 HE 染色观察细胞形态, 并采用细胞角蛋白 CK18 对细胞进行鉴定。分别在作用 12, 24, 48h 后采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 比色法检测各组细胞抑制率, 蛋白质印迹法 (Western-Blot) 和免疫组织化学法观察不同浓度的曲尼司特作用 24h 后细胞表达转化生成因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )、血小板衍化生长因子受体 A (PDGFR-A) 蛋白的情况。

结果: 相同时间点不同浓度曲尼司特对细胞抑制率随浓度增加而增大, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。TGF- $\beta_1$  蛋白表达定位于细胞浆, PDGFR-A 蛋白定位于胞膜和胞浆, 它们的表达量都随曲尼司特浓度的增加而下调, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

结论: 曲尼司特可以抑制人 RPE 细胞的增殖, 并有剂量依赖性, 其机制可能与下调 TGF- $\beta_1$  和 PDGFR-A 蛋白表达有关。

关键词: 曲尼司特; 增殖性玻璃体视网膜病变; 人视网膜色素上皮细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.10.07

引用: 余静, 庞东渤. 曲尼司特对体外培养人视网膜色素上皮细胞增殖的影响. 国际眼科杂志 2013;13(10):1970-1973

### 0 引言

增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是视网膜表面发生无血管的、纤维细胞性的膜增殖。其多发生在孔源性视网膜脱离修复术后, 由于视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE)、一些炎性细胞及炎性因子和胶质细胞等在视网膜表面和玻璃体内增殖, 特别是细胞因子对 RPE 细胞的刺激, 导致 PVR 膜形成收缩牵拉视网膜导致视网膜脱离, 是视网膜复位术后再脱离的主要原因<sup>[1]</sup>。目前在临床上还没有有效的治疗方法。曲尼司特最早作为一种抗变态反应药应用于临床, 后研究发现其还具有抑制平滑肌和成纤维细胞增殖, 抗新生血管形成和抗纤维化作用<sup>[2]</sup>, 但鲜有关于其用于 PVR 的研究, 本研究主要目的是观察曲尼司特对体外培养人 RPE 细胞增殖的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验仪器 超净工作台(苏州净化设备公司, SpiegAirTech);倒置显微镜(重庆光学仪器厂, XSZ-D2);离心机(北京医疗仪器维修厂, LHS-64-01);CO<sub>2</sub>培养箱(美国 SHELLAB);全自动酶标仪(美国 Sigma 公司, MDF-381 型);一次性 25mL 细胞培养瓶(丹麦 Delta 公司);微量加样器(法国, Eppendorf);96 孔培养板(丹麦 Delta 公司);6 孔培养板(丹麦 Delta 公司)。

1.1.2 实验试剂 人 RPE-19 细胞株(北京北纳创联生物技术研究院);曲尼司特(TNL, 江苏盐城麦迪科化学品制造有限公司);噻唑蓝(MTT, Amresco 公司分装);二甲基亚砷(DMSO, 苏州工业园区正兴化工研究院分析纯);DMEM 培养液(美国 Sigma 公司);胎牛血清(杭州四季青生物制品公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);特异性标记抗体 CK18, TGF- $\beta_1$ , PDGFR-A(北京博奥森生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 液氮中取出 RPE 细胞,立即放入 37℃ 水浴中复苏细胞,次日观察细胞生长状况,待细胞铺满时进行传代培养。传至 3~5 代后用于实验,实验分为曲尼司特浓度为 0(对照组),12.5,25,50,100mg/L 五组。

1.2.2 细胞爬片 胰酶消化细胞得细胞悬液,接种于置有灭菌盖玻片的六孔板内,细胞覆盖 40%后,PBS 浸洗,10%福尔马林固定 30min。

1.2.3 细胞形态学观察及鉴定 细胞爬片进行 HE 染色,具体步骤如下:PBS 洗 2 次×1min;苏木素染液染色 5min,自来水浸洗;稀盐酸乙醇进行分色数秒,自来水浸洗;淡氨水蓝化细胞核 3min,自来水浸洗;伊红染色 5min,自来水浸洗;乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察细胞形态并照相。抗人角蛋白 CK18 免疫细胞化学染色镜下细胞鉴定。

1.2.4 MTT 比色法检测不同浓度曲尼司特在不同作用时间对 RPE 细胞增殖的影响 胰酶消化细胞得细胞悬液接种,配成单个细胞悬液,调细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL,以 100 $\mu$ L/孔接种至 96 孔板,12h 后加入含曲尼司特的完全培养基 100 $\mu$ L/孔,使各孔终浓度为 0(对照组),12.5,25,50,100mg/L,每组设 6 个复孔。分别再培养 12,24,48h 后,每孔加入 MTT 液(5g/L)20 $\mu$ L,37℃ 培养 4h 后弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 $\mu$ L,轻轻振荡 10min,使结晶物充分溶解,在 490nm 波长酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 A 值,计算细胞抑制率。细胞增生抑制率计算公式:抑制率=[(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值]×100%。

1.2.5 Western-Blot 法检测各组细胞表达 TGF- $\beta_1$  和 PDGFR-A 蛋白的情况 各组细胞在药物作用 24h 后,收集细胞加入裂解液在 4℃,12000r/min 离心 20min,取上清蛋白定量后进行电泳、转膜及免疫印迹。兔抗人 TGF- $\beta_1$ (浓度 1:400)、PDGFR-A(浓度 1:300)及 CK-18(浓度 1:400)多克隆抗体 4℃ 孵育过夜;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 室温孵育 1h,ECL 显影拍照。凝胶图像处理系统进行半定量分析,以目的蛋白/ $\beta$ -action 比值为指标,条带灰度值越大,则细胞表达蛋白量越高。

表 1 不同浓度曲尼司特在不同作用时间后对 RPE 细胞增殖的抑制率 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

曲尼司特浓度(mg/L)	12h	24h	48h
12.5	16.32±7.88	16.27±7.17	13.90±8.41
25	26.82±5.59	22.15±13.90	21.17±10.17
50	35.89±12.09	24.57±14.51	23.61±11.80
100	39.03±18.13	34.48±4.47	30.53±8.45

1.2.6 免疫组织化学法检测各组细胞 TGF- $\beta_1$  和 PDGFR-A 蛋白表达的情况 六孔板中细胞爬片覆盖 40% 后进行换液并加入曲尼司特,使各孔曲尼司特浓度分别为 0,12.5,25,50,100mg/L。继续培养 24h 后,进行免疫组织化学,操作步骤具体如下:(1)10% 福尔马林固定 30min;(2)300mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇 2mL,室温浸泡 15min;(3)每孔加入 30mL/L 牛血清白蛋白 800 $\mu$ L,室温 30min,阻断非特异染色;(4)滴加兔抗 TGF- $\beta_1$ (浓度 1:1200)、PDGFR-A(浓度 1:800)70 $\mu$ L 4℃ 过夜;(5)辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 70 $\mu$ L,37℃ 30min;(6)DAB 显色;(7)苏木素复染,脱水,透明,封片,显微镜观察、照相。采用 IPP 专业图像分析软件,测定其平均灰度值。光密度值越大,染色越深,反映细胞内蛋白免疫活性(表达量)越高。

统计学分析:实验所得数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 17.0 进行统计学分析。细胞抑制率的比较采用析因分析,TGF- $\beta_1$  和 PDGFR-A 蛋白表达用单因素方差分析,两组间比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 细胞形态学观察鉴定 RPE 细胞呈扁平长梭形,胞质内含少量色素颗粒,胞核清晰可见,细胞贴壁生成。免疫组织化学结果显示,95% 以上细胞角蛋白抗体染色呈阳性,表明上皮细胞来源(图 1)。

2.2 不同浓度曲尼司特在不同作用时间对 RPE 细胞增殖的影响 作用同等时间随着曲尼司特剂量的加大,对细胞的抑制率也增强,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。相同剂量的曲尼司特作用时间越长,对细胞的抑制越弱,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 1)。

2.3 Western-Blot 法观察曲尼司特对 TGF- $\beta_1$  和 PDGFR-A 蛋白的影响 12.5,25,50,100mg/L 曲尼司特作用 24h 后,与对照组相比 TGF- $\beta_1$  蛋白的相对表达量分别为 0.94±0.02,0.67±0.02,0.52±0.03,0.37±0.02;随曲尼司特浓度的增加,TGF- $\beta_1$  蛋白的表达逐渐下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。12.5,25,50,100mg/L 曲尼司特作用 24h 后,与对照组相比 PDGFR-A 蛋白的相对表达量分别为 0.39±0.01,0.33±0.01,0.31±0.00,0.30±0.01,随曲尼司特浓度的增加 PDGFR-A 蛋白的表达逐渐下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 2)。

2.4 免疫组织化学结果 TGF- $\beta_1$  阳性表达定位于细胞浆,为棕黄色颗粒样物质(图 3)。与对照组相比,曲尼司特处理后,TGF- $\beta_1$  光密度值明显降低( $P < 0.05$ ),说明 TGF- $\beta_1$  表达降低,曲尼司特可抑制 TGF- $\beta_1$  的表达。PDGFR-A 阳性表达定位于胞浆及胞膜,为棕黄色颗粒样

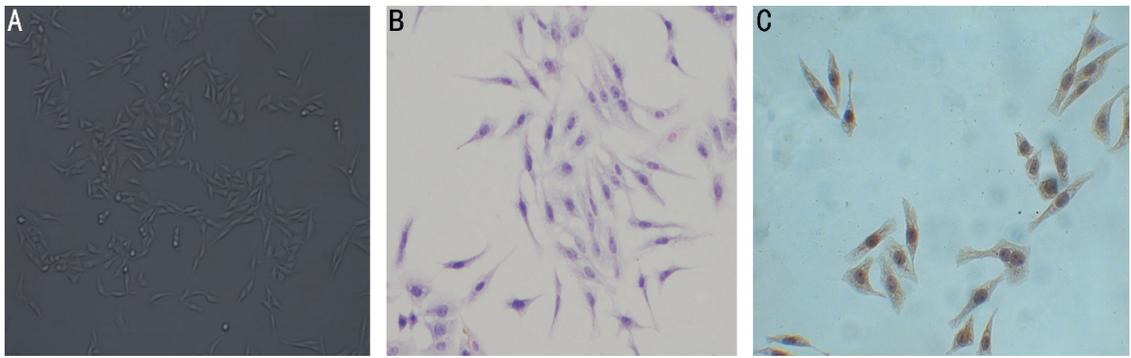


图1 细胞形态学观察鉴定 A:倒置显微镜下细胞形态( $\times 400$ );B:HE染色观察细胞形态( $\times 100$ );C:免疫细胞化学染色观察细胞角蛋白表达情况( $\times 100$ )。

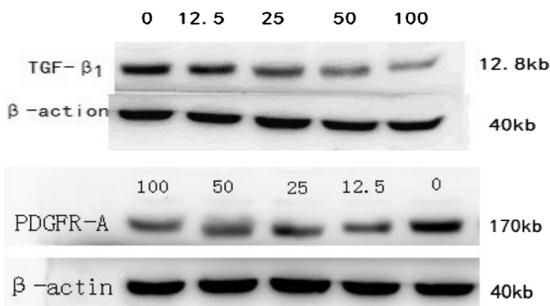


图2 各组 TGF- $\beta_1$  和 PDGFR-A 蛋白表达情况 A: TGF- $\beta_1$ ; B: PDGFR-A。

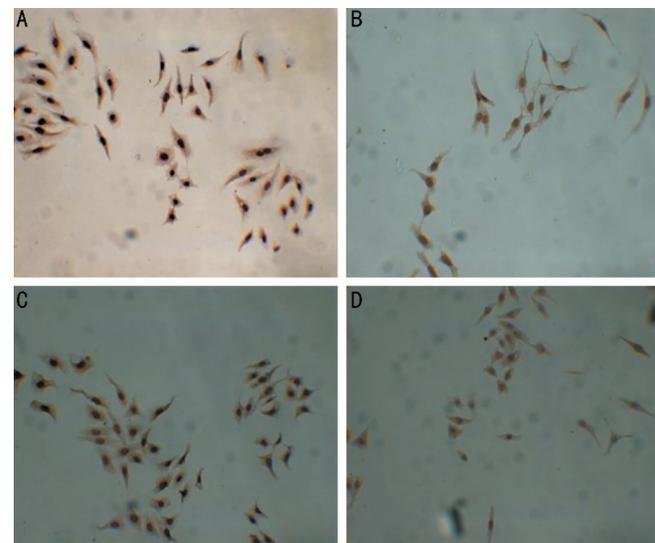


图3 免疫组织化学法检测各组细胞 TGF- $\beta_1$  和 PDGFR-A 蛋白表达的情况( $\times 100$ ) A: PDGFR-A 在 RPE 中的表达;B: 曲尼司特 100mg/L 作用 24h 后 PDGFR-A 表达;C: TGF- $\beta_1$  在 RPE 中的表达;D: 曲尼司特 100mg/L 作用 24h 后 TGF- $\beta_1$  表达。

物质(图3)。与对照组相比,曲尼司特处理后,PDGFR-A 光密度值明显降低( $P < 0.05$ ),说明 PDGFR-A 表达降低,曲尼司特可抑制 PDGFR-A 的表达。

### 3 讨论

RPE 细胞在 PVR 的发生发展中起着重要作用,它不仅是形成 PVR 膜和收缩的主要细胞,同时还产生各种细胞因子,如 PDGF 和血管内皮生长因子(VEGF)、TGF 和肝细胞生长因子(HGF)等<sup>[3]</sup>,而这些因子又能促进 RPE 细胞的增殖,恶性循环,诱导触发一系列细胞反应,因此抑制

RPE 细胞的增殖是防治 PVR 发生的关键。体外培养 RPE 细胞具有无限增殖能力,并向成纤维细胞转变<sup>[4]</sup>,在本实验中也可见未经曲尼司特处理的 RPE 细胞增殖旺盛,因此体外培养 RPE 细胞常作为研究 PVR 模型。

曲尼司特(TNL)最早是日本学者 Koda 等<sup>[5]</sup>研制的一种抗变态反应药,用于过敏性鼻炎和支气管哮喘等,其滴眼液 Rizaben 也已在临床治疗春季结膜炎和过敏性结膜炎,尚未见明显副作用。在本实验中,用 0(对照组),12.5,25,50,100mg/L 的曲尼司特,分别作用 RPE 细胞 12,24,48h 后,用 MTT 法检测 RPE 细胞的抑制率发现,随着曲尼司特浓度的增加,对细胞的抑制越强。因此我们预测曲尼司特可抑制 PVR 的发生发展。

以往研究表明,TGF- $\beta_1$  和 PDGF 因子是参与 PVR 发生的重要因子<sup>[6,7]</sup>,Choudhury 等<sup>[8]</sup>认为在增生性病变中,他们有较强的促细胞分裂作用,并相互依赖,相互促进。Rosengren 等<sup>[9]</sup>也发现 TGF- $\beta_1$  和 PDGF 因子具有协同作用。PDGF 有两个受体  $\alpha$  和  $\beta$ ,而 PVR 的发生主要是  $\alpha$  受体介导的,邱梅园等<sup>[10]</sup>通过向 HRPE 细胞内转染 PDGFR-A 基因的反义寡核苷酸,发现沉默 PDGFR-A 基因的表达可明显抑制 RPE 细胞的增殖。熊蕾等<sup>[11]</sup>的动物实验表明,抑制  $\alpha$  受体的表达发生兔视网膜牵拉性脱离的风险明显低于  $\beta$  受体抑制剂组。综述,下调 TGF- $\beta_1$  和 PDGFR-A 蛋白的表达,将能有效预防 PVR 的发生。

随着研究的不断深入发现,曲尼司特可下调 TGF- $\beta_1$  和 PDGF 等细胞因子的表达<sup>[12,13]</sup>,抑制细胞增殖。因此本实验初步探讨曲尼司特抑制 RPE 细胞的增殖可能与其下调 TGF- $\beta_1$  和 PDGFR-A 蛋白的表达相关。本研究中分别采用蛋白质印迹法和免疫组织化学法观察曲尼司特作用 24h 后细胞表达 TGF- $\beta_1$  及 PDGFR-A 蛋白的情况,发现曲尼司特可下调 TGF- $\beta_1$  及 PDGFR-A 蛋白的表达,并具有一定的剂量依赖性。

Ito 等<sup>[14]</sup>采用成纤维细胞注射制造兔眼 PVR 模型,发现注射曲尼司特组 PVR 等级及 TGF- $\beta_1$  蛋白的表达量都远低于对照组,并无明显毒性作用。Yasukawa 等<sup>[15]</sup>指出曲尼司特可以抑制牛 RPE 及成纤维细胞的增殖,并对眼内纤维膜的收缩也有一定作用,这些都与其抑制了 TGF- $\beta_1$  蛋白的表达有关,对 PVR 的防治具积极意义。本实验结果都与这些研究相一致。但本实验只是初步在体外证实曲尼司特可抑制 RPE 细胞的增殖,其可能机制与其下调

TGF- $\beta_1$ 及PDGFR-A蛋白的表达有关,但对其确切机制及药物最佳作用浓度及用药途径等都还有待进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 惠延年. 增生性玻璃体视网膜病变: 带入 21 世纪的课题. 中华眼底病杂志 1999;15(1):67-68
- 2 Isaji M, Miyata H, Ajisawa Y, et al. Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Br J Pharmacol* 1997;122(6):1061-1066
- 3 Enzmann V, Kaufmann A, Hollborn M, et al. Effective chemokines and cytokines in the rejection of human retinal pigment epithelium (RPE) cell grafts. *Transpl Immunol* 1999;7(1):9-14
- 4 Tezel TH, KaPlan HJ, DeI Priore LV. Fate of human retinal Pigment epithelial cells seeded onto layers of human bruchs menbrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:467-476
- 5 Koda A, Nagai H, Watanabe S, et al. Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, N(3',4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5'). *J Allergy Clin Immunol* 1976;57:396-407
- 6 Moon SW, Chung EJ, Jung SA, et al. PDGF stimulation of Muller cell proliferation: contributions of c-JNK and the PI3K/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388:167-171
- 7 Chung EJ, Chun JN, Jung SA, et al. TGF- $\beta$ -stimulated aberrant expression of class III  $\beta$ -tubulin via the ERK signaling pathway in cultured retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;415(2):367
- 8 Choudhury P, Chen W, Hunt RC. Production of platelet-derived growth

factor by interleukin - 1 beta and transforming growth factor - beta - stimulated retinal pigment epithelial cells leads to contraction of collagen gels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(5):824-833

- 9 Rosengren S, Corr M, Boyle DL. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta synergistically potentiate inflammatory mediator synthesis by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2010;12(2):1186
- 10 邱梅园, 彭燕一, 黄岚珍, 等. PDGF- $\alpha$ 受体反义寡核苷酸对体外视网膜色素上皮细胞增殖和凋亡的影响. 国际眼科杂志 2011;11(2):229-231
- 11 熊蕾, 权颜龙, 郑玉萍, 等. 血小板源性生长因子受体 $\alpha$ 在兔增殖性玻璃体视网膜病变中的作用. 国际眼科杂志 2008;8(1):6-9
- 12 Tokuyama H, Kelly DJ, Cox A, et al. Tranilast ameliorates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 2008;109(1):e1-7
- 13 Ward MR, Sasahara T, Agrotis A, et al. Inhibitory effects of tranilast on expression of transforming growth factor-beta isoforms and receptors in injured arteries. *Atherosclerosis* 1998;137(2):267-275
- 14 Ito S, Sakamoto T, Tahara Y, et al. The effect of tranilast on experimental proliferative vitreoretinopathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237:691-696
- 15 Yasukawa T, Kimura H, Dong J, et al. Effect of tranilast on proliferation, collagen gel contraction, and transforming growth factor beta secretion of retinal pigment epithelial cells and fibroblasts. *Ophthalmic Res* 2002;34(4):206-212