

# 贝伐单抗对体外培养的人视网膜色素上皮细胞增殖及纤维化的影响

李 婵<sup>1</sup>, 任 伟<sup>2</sup>

作者单位:(710068)中国陕西省西安市,陕西省人民医院<sup>1</sup>眼科;<sup>2</sup>外科

作者简介:李婵,女,主治医师,研究方向:眼表及视网膜疾病。

通讯作者:李婵. 13991219091@163.com

收稿日期:2016-04-26 修回日期:2016-07-05

## Effects of Bevacizumab on the proliferation and epithelial-mesenchymal transition in human retinal pigment epithelial cells *in vitro*

Chan Li<sup>1</sup>, Wei Ren<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology; <sup>2</sup>Department of Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Chan Li. Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China. 13991219091@163.com

Received:2016-04-26 Accepted:2016-07-05

### Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of Bevacizumab on the proliferation and the expression of E-Cadherin and fibronectin in human retinal pigment epithelial cell (ARPE-19) *in vitro*.

• **METHODS:** Different concentrations (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0mg/mL) of bevacizumab were exposed to ARPE-19 cells, then cell viability was analyzed by CCK-8, cell cycle was determined by flow cytometry, and the expression of E-Cadherin and fibronectin was detected by Western blot and RT-PCR.

• **RESULTS:** The concentration as 2.5mg/mL or 5.0mg/mL of bevacizumab was shown to effectively suppress the proliferation and cell cycle of ARPE-19 cell ( $P < 0.05$ ). In addition, 2.5mg/mL or 5.0mg/mL of bevacizumab could downregulate the expression of E-cadherin and promote the transcription of fibronectin gene ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** High concentration of bevacizumab was able to inhibit ARPE-19 proliferation, downregulate E-Cadherin expression and promote fibronectin expression, indicating epithelial-mesenchymal transition induced by bevacizumab in ARPE-19 cell.

• **KEYWORDS:** bevacizumab; human retinal pigment epithelial cell; proliferation; epithelial-mesenchymal transition

**Citation:** Li C, Ren W. Effects of Bevacizumab on the proliferation and epithelial-mesenchymal transition in human retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(8):1449-1452

### 摘要

**目的:**观察贝伐单抗对体外培养的人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 增殖及钙黏连蛋白(E-cadherin)和纤维连接蛋白(fibronectin)表达变化的作用,探讨贝伐单抗对 ARPE-19 增殖及纤维化的影响。

**方法:**用不同浓度(0、0.625、1.25、2.5、5.0mg/mL)的贝伐单抗干预体外培养人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19,采用 CCK-8 法分别于 24、48、72h 检测细胞活性;流式细胞仪检测细胞周期;应用免疫蛋白印迹法(Western blotting)及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 ARPE-19 中 E-cadherin 和 fibronectin 的蛋白及 mRNA 的表达变化。

**结果:**浓度为 2.5、5.0mg/mL 贝伐单抗能有效抑制 ARPE-19 细胞的增殖及细胞周期,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。2.5、5.0mg/mL 贝伐单抗能抑制 E-cadherin 基因,促进 fibronectin 基因的转录及表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**结论:**高浓度的贝伐单抗能够抑制 ARPE-19 细胞的增殖,下调纤维化相关因子 E-cadherin,同时上调 fibronectin 的表达,提示高浓度的贝伐单抗可以引起 ARPE-19 细胞纤维化。

**关键词:**贝伐单抗;人视网膜色素上皮细胞;增殖;纤维化  
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.8.11

**引用:**李婵,任伟.贝伐单抗对体外培养的人视网膜色素上皮细胞增殖及纤维化的影响.国际眼科杂志 2016;16(8):1449-1452

### 0 引言

渗出性年龄相关性黄斑变性是发达国家第一位的致盲眼病,其主要特征是黄斑部视网膜下脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)等生成,并伴有反复出血、渗出等病理改变。一旦这些新的异常血管开始生长,经常会引起出血,导致进一步的愈合反应和视网膜下纤维化。玻璃体腔注射血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)单克隆抗体是目前此种疾病的一线治疗方法<sup>[1]</sup>。贝伐单抗是人源化抗 VEGF 的 IgG 单克隆抗体,被美国食品药品监督管理局批准用于治疗结肠癌,现在被广泛用于脉络膜新生血管性疾病的治疗<sup>[2]</sup>。但随着抗 VEGF 药物的广泛应用及随访时间的延长,抗 VEGF 治疗的副作用也逐渐显现。越来越多的研究报道,抗 VEGF 治疗后无论是 CNV 还是视网膜新生血管均可发生较严重的纤维化<sup>[3-4]</sup>。抗血管新生药物的应

用加刷了 CNV 病理纤维发生,但潜在的机制仍不清楚。因此,本研究将观察贝伐单抗对体外培养的人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 增殖及钙黏连蛋白(E-cadherin)和纤维连接蛋白(fibronectin)表达变化的作用,探讨贝伐单抗对 ARPE-19 增殖及纤维化的影响。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 (美国 ATCC 公司),贝伐单抗(美国罗氏),DMEM/F<sub>12</sub> 培养基、胎牛血清、青霉素及链霉素溶液、胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),CCK-8 试剂盒(上海七海生物公司),碘化丙啶 PI、RNaseA (美国 Sigma 公司),流式细胞仪 FACSCalibur (BD Biosciences),一抗(鼠抗人 anti-E-cadherin、兔抗人 anti-fibronectin)及二抗(美国 Abcam 公司),Real-Time PCR 试剂盒(日本 Takara 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及实验分组** ARPE-19 细胞系购自美国 ATCC 公司,按说明复苏,用 DMEM/F<sub>12</sub> 培养液(含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素)在 37℃,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,每 48h 更换新鲜培养液,待细胞融合长满瓶底 80% 左右,按 1:3 比例消化传代。按贝伐单抗干预终浓度分为 0、0.625、1.25、2.5、5.0mg/mL 共 5 组。

### 1.2.2 CCK8 检测各组人视网膜色素上皮细胞活性

ARPE-19 细胞经胰蛋白酶消化后以 5×10<sup>3</sup>/孔接种在 96 孔板,于细胞培养箱中继续培养 12h 后,更换新鲜培养基按实验分组用不同浓度贝伐单抗干预细胞,每组每个时间点均设置 5 个复孔。分别于 24、48、72h 后,每孔加入 10μL 的 CCK-8 试剂,继续培养 2h 后,使用自动酶联免疫分析仪,在 450nm 吸收波长处测量各组细胞的吸光度值(A<sub>450</sub>),计算每组的平均值。实验独立重复 3 次。

### 1.2.3 流式细胞仪检测各组人视网膜色素上皮细胞周期

ARPE-19 细胞经胰蛋白酶消化后以 5×10<sup>5</sup>/孔接种在 6 孔板,于细胞培养箱中继续培养 12h 后,更换新鲜培养基按实验分组用不同浓度贝伐单抗干预细胞,24h 后用胰酶消化成单细胞悬液后混入冰 75% 无水乙醇,4℃ 静置过夜,离心弃上清,PBS 漂洗 3 次,100μg/mL PI 0.5mL 及 100μg/mL RNase A 0.5mL 作用 30min(37℃,避光),用流式细胞仪 FACSCalibur (BD Biosciences) 分析,激发波长为 488nm 及 630nm,上述步骤至少重复 3 次实验。

**1.2.4 RT-PCR 检测各组人视网膜色素上皮细胞 E-cadherin 和 fibronectin 的 mRNA 表达水平** 不同浓度贝伐单抗干预 24h 后收集细胞,按照试剂盒说明提取各组细胞 mRNA。根据反转录试剂盒说明书对提取的 E-cadherin 和 fibronectin 的 mRNA 进行反转录。引物由上海生工生物技术公司合成,GAPDH 为内参,引物序列见表 1。PCR 反应条件:95℃ 预变性 30s,95℃ 变性 5s,60℃ 退火 30s,共 40 个循环。获取各组样品的标准曲线,以 GAPDH 为内参分析其 Ct 值。实验重复 3 次。引物由上海生工生物技术公司合成,所有 PCR 反应由 PCR 仪完成,GAPDH 为内参,计算各组相对定量值(RQ 值)。

**1.2.5 Western blotting 测定各组人视网膜色素上皮细胞 E-cadherin 和 fibronectin 蛋白的表达** 不同浓度贝伐单抗干预 24h 后收集细胞,提取各组细胞总蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,按每个样本 5μg 总蛋白上样,100g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳;4℃ 下 100mA 电

表 1 RT-PCR SYBR Green 法引物序列

目的基因	引物序列(5'→3')
E-cadherin	F:CCC ACC ACG TAC AAG GGT C
	R:CTG GGG TAT TGG GGG CAT C
fibronectin	F:GCG AGA GTG CCC CTA CTA CA
	R:GTT GGT GAA TCG CAG GTC A
GAPDH	F:GGA GTC CAC TGG CGT CTT C
	R:GCT GAT GAT CTT GAG GCT G

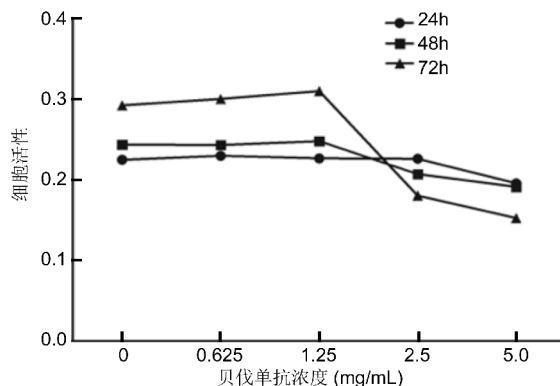


图 1 不同浓度的贝伐单抗对 ARPE-19 细胞株活性的影响。

转膜 3h,50g/L 脱脂奶粉室温封闭 1h,E-cadherin 和 fibronectin 一抗(浓度为 1:1000)4℃ 孵育过夜。第 2d 滴加辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗兔 IgG,浓度为 1:100000)室温孵育 1h。免疫反应结束后用 Western blotting 荧光剂发光、显影。Gel-Dev 凝胶成像系统照相,应用 Image J 图像分析软件,通过目的基因与内参条带的吸光度值比值进行目的蛋白的相对含量分析。

统计学分析:所有数据应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,计量数据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)或 $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度的贝伐单抗对各组人视网膜色素上皮细胞活性的变化** CCK8 检测结果显示,用不同浓度的贝伐单抗干预 ARPE-19 细胞株 24h 时,其中 0mg/mL 组(0.2254±0.01734)、0.625mg/mL 组(0.2300±0.01707)、1.25mg/mL 组(0.2268±0.01591)、2.5mg/mL 组(0.2264±0.01169)的组间无统计学差异( $P > 0.05$ ),5.0mg/mL 组(0.1954±0.01194)细胞活性下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在作用 48h 时,其中 0mg/mL 组(0.2438 ± 0.02255)、0.625mg/mL 组(0.2432±0.01844)、1.25mg/mL 组(0.2480 ± 0.02573)的组间无统计学差异( $P > 0.05$ ),2.5mg/mL 组(0.2072±0.01038)和 5.0mg/mL 组(0.1914 ± 0.00832)细胞活性下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在作用 72h 时,其中 0mg/mL 组(0.2922 ± 0.01238)、0.625mg/mL 组(0.3002±0.01794)、1.25mg/mL 组(0.3100 ± 0.01239)的组间无统计学差异( $P > 0.05$ ),2.5mg/mL 组(0.1806±0.01958)和 5.0mg/mL 组(0.1528±0.01555)细胞活性明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 1)。

**2.2 流式细胞仪检测细胞周期** 流式结果显示( $\chi^2$  检验):不同浓度的贝伐单抗干预 ARPE-19 细胞株 24h 后,其中 0mg/mL 组(S 期占 22.34% ± 3.11%)、0.625mg/mL

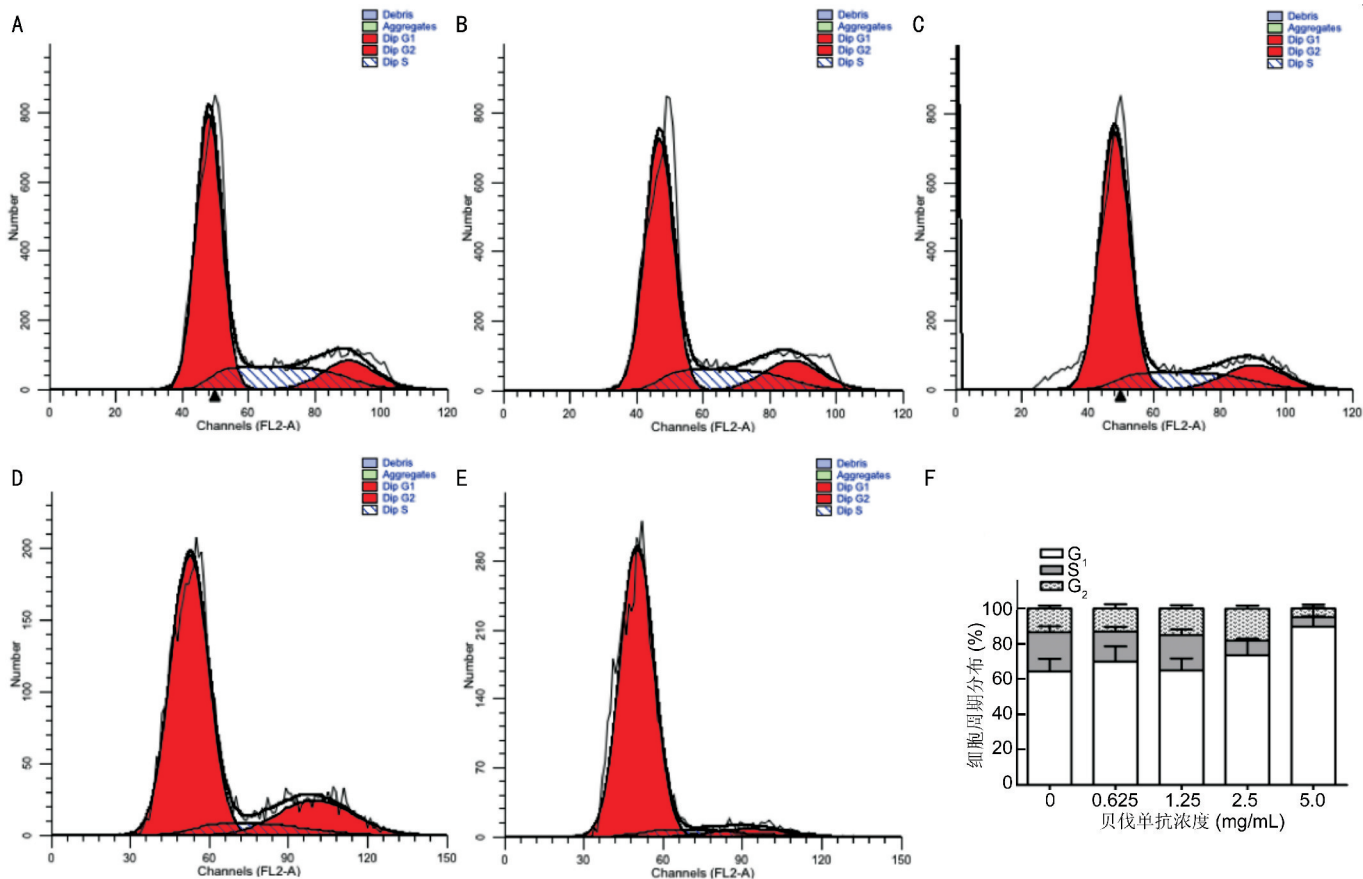


图2 不同浓度的贝伐单抗对 ARPE-19 细胞株细胞周期的影响 A:0mg/mL 组;B:0.625mg/mL 组;C:1.25mg/mL 组;D:2.5mg/mL 组;E:5.0mg/mL 组;F:流式细胞仪检测细胞周期变化。

组(S 期占 17.11% ± 2.68%)、1.25mg/mL 组(S 期占 20.07% ± 3.12%)的组间 S 期百分比无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 2.5mg/mL 组(S 期占 8.22% ± 1.21%)、5.0mg/mL 组(S 期占 5.52% ± 0.58%)的组间 S 期百分比明显下降, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ , 图 2)。

**2.3 各组人视网膜色素上皮细胞中 E-cadherin 和 fibronectin 的 mRNA 表达水平** RT-PCR 结果显示, 不同浓度的贝伐单抗干预 ARPE-19 细胞株 24h 后, 2.5mg/mL 组及 5.0mg/mL 组 E-cadherin mRNA 表达降低, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 而 0、0.625、1.25mg/mL 组 E-cadherin mRNA 表达无明显变化, 无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。2.5mg/mL 组及 5.0mg/mL 组 fibronectin mRNA 表达升高, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 而 0、0.625、1.25mg/mL 组 fibronectin mRNA 表达无明显变化, 无统计学差异 ( $P > 0.05$ , 图 3)。

**2.4 各组人视网膜色素上皮细胞中 E-cadherin 和 fibronectin 蛋白的表达** Western blotting 结果显示, 不同浓度的贝伐单抗干预 ARPE-19 细胞株 24h 后, 2.5mg/mL 组及 5.0mg/mL 组 E-cadherin 蛋白表达降低, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 但 2.5mg/mL 组与 5.0mg/mL 组之间降低不明显, 无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 而 0、0.625、1.25mg/mL 组 E-cadherin 蛋白表达无明显变化, 无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。2.5mg/mL 组及 5.0mg/mL 组 fibronectin 蛋白表达升高, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 但 2.5mg/mL 组与 5.0mg/mL 组之间升高不明显, 无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 而 0、0.625、1.25mg/mL 组 fibronectin 蛋白表达无明显变化, 无统计学差异 ( $P > 0.05$ , 图 4)。

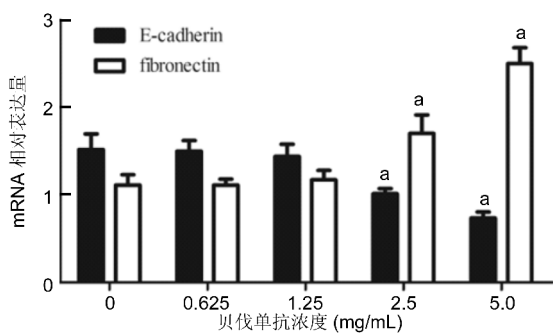


图3 不同浓度的贝伐单抗对 ARPE-19 细胞株 E-cadherin 和 fibronectin 的 mRNA 表达水平的影响 <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 0mg/mL 组。

### 3 讨论

Spitzer 等<sup>[5]</sup>在贝伐单抗对不同种类视网膜细胞毒性研究中发现, 0.008 ~ 2.5mg/mL 贝伐单抗在 24h 时对小鼠视网膜神经节细胞(RGC5)、脉络膜内皮细胞和 ARPE19 均未见毒性作用, 但在 2.5mg/mL 贝伐单抗作用 48h 时观察到 ARPE19 的细胞数和细胞活性轻度下降, 提示在 0.25mg/mL 的常规临床用药剂量下是相对安全的, 同时发现高剂量(2.5mg/mL)的贝伐单抗可能对 ARPE19 是有害的。后续在 Brar 等<sup>[6]</sup>研究结果中同样显示 2.0mg/mL 贝伐单抗在 24h 时可以抑制猴脉络膜内皮细胞(RF6A), 但对 RGC5 和 ARPE19 均未见毒性作用。

在本研究中我们发现, 0.625 ~ 2.5mg/mL 贝伐单抗作用 24h 时对 ARPE19 细胞活性未见明显影响, 但在



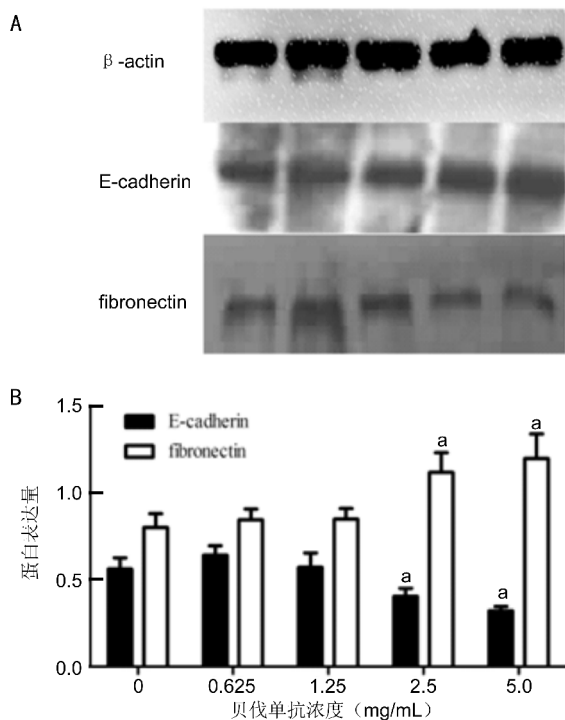


图4 各组人视网膜色素上皮细胞中 E-cadherin 和 fibronectin 蛋白的表达 A: E-cadherin 和 fibronectin 蛋白条带图; B: E-cadherin 和 fibronectin 蛋白表达的柱形图 (<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 0mg/mL 组)。

5.0mg/mL 时细胞活性轻度下降。干预时间延长到 48h 时,在 2.5mg/mL 和 5mg/mL 组均可观察到细胞活性的轻度下降。进一步延长干预时间到 72h 时,2.5mg/mL 和 5mg/mL 组均显示出明显的细胞活性抑制。表明高浓度的贝伐单抗对 ARPE19 有明显的毒性作用,且呈时间相关性。流式细胞检测表明贝伐单抗作用 24h 时,2.5mg/mL 和 5mg/mL 组 S 期细胞百分比明显降低, G<sub>1</sub>/S 期阻滞。进一步表明高浓度贝伐单抗通过阻滞 G<sub>1</sub>/S 期抑制细胞增殖。而近期研究表明贝伐单抗能够通过诱导 p53 表达,上调 p16、p21、p27 的表达,进而抑制 cyclinD 和 E,以及 CDK2, 4,6 的表达,最终减少 ppRb 表达以及导致细胞周期 G<sub>1</sub>/S 期阻滞<sup>[7]</sup>。

Bloch 等<sup>[8]</sup> 研究发现,AMD 患者在应用抗 VEGF 药物后 1a 或者更短的时间内出现了黄斑中心凹下的纤维化。Heier<sup>[9]</sup> 随访发现,应用抗 VEGF 药物治疗 2~6a 后有超过 50% 患者黄斑部发生了严重纤维化。目前,新生血管纤维化牵拉条带形成引起的牵拉性视网膜脱离,已成为影响抗 VEGF 药物治疗效果的重要原因<sup>[10-14]</sup>。体外研究中发现,贝伐单抗能够上调人 RPE 细胞中 CTGF、bFGF、TGF-β<sub>2</sub> 及 MMP-2 的表达,可能有促进纤维化的作用<sup>[15]</sup>。上皮细胞生物学标记物钙黏附蛋白(E-cadherin)及间质细胞生物学标记物 fibronectin 是 EMT 特异性的生物学标志。E-cadherin 是一种主要存在于人和动物上皮的黏附分子,主要功能是维持正常上皮细胞形态和结构完整性。fibronectin 具有促进细胞黏附、迁移、增殖、分化的作用,进而能促进成纤维细胞、内皮细胞生长。本次研究

发现:高浓度的贝伐单抗能够下调纤维化相关因子 E-cadherin,同时上调 fibronectin 的表达,提示高浓度的贝伐单抗可以引起 ARPE-19 细胞纤维化。

本研究观察了不同浓度贝伐单抗对 ARPE-19 细胞增殖及纤维化的作用,证明高浓度的贝伐单抗能够抑制 ARPE-19 细胞的增殖,下调纤维化相关因子 E-cadherin,同时上调 fibronectin 的表达,提示高浓度的贝伐单抗可以引起 ARPE-19 细胞纤维化。

参考文献

- 1 Yi WH, Wei RL, Cai JP, et al. The expression and significance of VEGF and TGF-13, in orbital cavernous hemangioma. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2004;4(2):247-249
- 2 Group CR, Martin DF, Maguire MG, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2011;364(20):1897-1908
- 3 Van Geest RJ, Lesnik-Oberstein SY, Tan HS, et al. A shift in the balance of vascular endothelial growth factor and connective tissue growth factor by bevacizumab causes the angiofibrotic switch in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2012;96(4):587-590
- 4 Heier JS. Pathology beyond neovascularization; new targets in age-related macular degeneration. *Retina* 2009;29(6):39-41
- 5 Spitzer MS, Wallenfels-Thilo B, Sierra A, et al. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol* 2006;90(10):1316-1321
- 6 Brar VS, Sharma RK, Murthy RK, et al. Evaluation of differential toxicity of varying doses of bevacizumab on retinal ganglion cells, retinal pigment epithelial cells, and vascular endothelial growth factor-enriched choroidal endothelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25(6):507-511
- 7 Kuo CN, Chen CY, Lai CH, et al. Cell cycle regulation by bevacizumab in ARPE-19 human retinal pigment epithelial cells. *Mol Med Rep* 2012;6(4):701-704
- 8 Bloch SB, Larsea M. Fibrosis of extramacular angioid streaks following ranibizumab treatment of subfoveal choroidal neovascularization. *Acta Ophthalmologica* 2011;89(1):e102-e104
- 9 Heier JS. Pathology beyond neovascularization; new targets in age-related macular degeneration. *Retina* 2009;29(6):39-41
- 10 de Juan E, Hickingbotham D, McCuen BW 2nd, et al. The pic-forceps for removal of epiretinal membranes. *Am J Ophthalmol* 1984;98(4):518-519
- 11 Aiello CP. Endothelial growth factor induced retinal permeability is mediated by an orally effective α-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* 1997;46(9):1473-1480
- 12 Pe'er J, Shweiki D, Itin A, et al. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab Invest* 1995;72(6):638-645
- 13 Rosenfeld PJ, Schwartz SD, Blumenkranz MS, et al. Maximum tolerated dose of a humanized anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment for treating neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2005;112(6):1048-1053
- 14 Land K, Spaide RF, Freund KB, et al. Treatment of choroidal neovascularization in pathologic myopia with intravitreal bevacizumab. *Retina* 2006;26(8):960-963
- 15 张敏, 储三军, 曾繁星, 等. Bevacizumab 对视网膜色素上皮细胞纤维化相关因子表达的影响. *眼科新进展* 2014;34(4):318-321