

# 苦参碱体外对兔晶状体上皮细胞细胞周期的影响

王 智, 何湘珍, 彭辉灿, 肖启国, 刘嘉毅

作者单位: (421001) 中国湖南省衡阳市, 南华大学附属第二医院眼科

作者简介: 王智, 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 白内障、斜弱视。

通讯作者: 王智. wzhiri@yahoo. com. cn

收稿日期: 2009-10-14 修回日期: 2009-12-28

## Effect of matrine on cell cycle of rabbit lens epithelial cells *in vitro*

Zhi Wang, Xiang-Zhen He, Hui-Can Peng, Qi-Guo Xiao, Jia-Yi Liu

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Zhi Wang. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. wzhiri@yahoo. com. cn

Received: 2009-10-14 Accepted: 2009-12-28

### Abstract

• AIM: To study the effects of matrine (Mat) on cell cycle of rabbit lens epithelial cells (RLECs) *in vitro*.

• METHODS: 0.5g, 1.0g and 1.5g/L Mat was added to the RLECs *in vitro* for 72 hours culture respectively. The cell cycle of RLECs was analyzed by flow cytometer (FCM).

• RESULTS: The percentage of RLECs in S stage was decreased significantly by Mat ( $P < 0.05$ ), while with a significant increase in the percentage of  $G_0-G_1$  stage cells ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: Mat could effectively prevent cell division to inhibit the proliferation of RLECs *in vitro*.

• KEYWORDS: matrine; lens epithelial cell; cell proliferation; posterior capsular opacification; rabbit; cell cycle

Wang Z, He XZ, Peng HC, *et al.* Effect of matrine on cell cycle of rabbit lens epithelial cells *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(2):233-234

### 摘要

目的: 研究苦参碱(matrine, Mat)体外对兔晶状体上皮细胞细胞周期的影响。

方法: 将0.5, 1.0和1.5g/L的苦参碱作用于体外培养的兔晶状体上皮细胞, 通过流式细胞仪检测其细胞周期各时相的百分比。

结果: 不同浓度梯度的苦参碱作用体外培养的兔晶状体上皮细胞72h后, 与对照组及各浓度的Mat组之间相互比较, 随着苦参碱浓度增高,  $G_0-G_1$ 期细胞数量明显增加( $P < 0.05$ ), S期细胞明显减少( $P < 0.05$ ), 呈明显的剂量-效应关系。

结论: 苦参碱能明显抑制体外培养的兔晶状体上皮细胞的增殖活性和细胞有丝分裂。

关键词: 苦参碱; 晶状体上皮细胞; 细胞增生; 后囊膜混浊; 兔; 细胞周期

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.02.010

王智, 何湘珍, 彭辉灿, 等. 苦参碱体外对兔晶状体上皮细胞细胞周期的影响. 国际眼科杂志 2010;10(2):233-234

### 0 引言

后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO) 是现代白内障超声乳化吸除联合人工晶状体植入术后导致患者远期视力下降最常见的并发症, 其发生率与年龄相关, 年龄越轻, 发生率越高, 在成人, 术后发生率为30%~50%, 在儿童则为100%。研究表明, PCO的形成过程是创伤修复反应的过程, 主要是由白内障术后残留的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cell, LEC) 过度增生并移行于后囊膜, 增生或者转化为成纤维细胞, 产生胶原, 分泌基底膜样物质而引起, 葡萄膜细胞、巨噬细胞、炎症细胞等也参与了该过程<sup>[1]</sup>。因此, 若能有效抑制晶状体上皮细胞的增生, 将对PCO的防治起着非常重要的作用。我们研究不同浓度的苦参碱(matrine, Mat)对兔晶状体上皮细胞 (rabbit lens epithelial cell, RLEC) 细胞周期的影响并探讨其可能的机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 Mat, 西安鸿生生物技术有限公司; DMEM 干粉培养基, 美国 Invitrogen 公司; 胰蛋白酶, 北京华美生物工程公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 美国 Hyclone 公司; 流式细胞仪, 美国 Bechman Coulter Epics Altrag 型; 低温高速离心机, Hettich 公司 MikrO22R 型。新西兰家兔以空气栓塞法处死, 常规无菌操作取出眼球, 完整暴露晶状体, 用眼科镊将晶状体前囊膜连同赤道部囊膜撕下, 将前囊膜小心剪为大小约  $1\text{mm}^3$  的小块, 用眼科镊送入培养瓶内, 加入适量培养液, 盖好瓶盖, 将培养瓶置入  $37^\circ\text{C}$ , 50mL/L 的  $\text{CO}_2$ , 95% 湿度的  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中进行原代及传代培养。在培养的初期, 24~48h 后可见很少量的 RLEC 从囊膜片边缘游出, 但并不是所有囊膜边缘都有细胞游出, 4~5d, 囊膜片边缘可见游出的细胞逐渐增加, 呈多边形, 有突起, 细胞透亮, 胞质丰富, 胞体肥大, 胞膜清晰。RLEC 生长迅速, 在 7~10d 生长最为旺盛, 约 2wk 左右达到融合。传代时, 经胰酶消化后的细胞呈圆球形, 一般在传代后 8~10h 基本完全贴壁, 一经贴壁, 细胞呈上皮样形态, 与原代细胞无明显差别。不能贴壁的细胞仍成圆球形, 漂浮状, 以后便死亡。取第 3 代细胞用于实验。

1.2 方法 取生长良好的第 3 代细胞以无血清 DMEM 培养液制成细胞悬液, 以  $1.0 \times 10^7$  个/L 的密度接种于 96 孔培养板, 每孔 200 $\mu\text{L}$ , 置于  $37^\circ\text{C}$ , 50mL/L 的  $\text{CO}_2$ , 95% 湿

表1 Mat体外对RLEC细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, \%, n=6$ )

	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> -M	PrI
对照组	40.16 ± 1.12	49.65 ± 1.21	10.21 ± 0.37	59.86 ± 2.57
Mat 0.5g/L	52.53 ± 0.76 <sup>a</sup>	38.16 ± 1.52 <sup>a</sup>	9.32 ± 0.24	47.49 ± 0.89 <sup>a</sup>
Mat 1.0g/L	67.01 ± 1.64 <sup>a</sup>	25.37 ± 2.13 <sup>a</sup>	7.62 ± 0.46	32.97 ± 1.37 <sup>a</sup>
Mat 1.5g/L	84.67 ± 2.66 <sup>a</sup>	10.61 ± 0.73 <sup>a</sup>	4.71 ± 0.15	15.32 ± 0.63 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs对照组

度的CO<sub>2</sub>恒温培养箱中,以含100mL/L的血清培养12h; 换含10mL/L的血清培养液培养24h后弃培养液,加入不同处理因素200μL继续培养72h。实验分为4组:空白对照组;实验组:分别加入0.5,1.0和1.5g/L的Mat,每组均设6个复孔。收获的细胞离心后弃去上清,0.01mol/L的PBS溶液洗涤2次,800r/min离心5min,加入0.01mol/L的PBS溶液1mL使成细胞悬液,边振荡边加入预冷的无水乙醇(固定液)2mL,冷藏待测。上机前用0.01mol/L的PBS溶液洗去固定液,用0.01mol/L的PBS溶液100μL制成单细胞悬液后,加入DNA染液500μL,室温避光染色15min,上流式细胞仪检测。检测结果用Multicycle软件进行细胞各时期细胞数百分比率分析。按公式计算增殖指数(PI):PI% = S% + (G<sub>2</sub>-M)%。

统计学分析:采用方差分析中的多个样本均数间的多重比较(Dunnett-t test),利用SPSS 12.0统计软件包对实验数据进行统计学分析。

## 2 结果

Mat 0.5,1.0和1.5g/L分别作用RLEC 72h后,细胞在G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期的比例增高,S期的比例降低,与对照组及各浓度的Mat组之间相互比较,具有显著性差异(P < 0.05)。增殖指数(PI)是反映细胞增殖活力的指标,与对照组及各浓度的Mat组之间相互比较,亦具有显著性差异(P < 0.05),呈明显的剂量-效应关系(表1)。

## 3 讨论

白内障是致盲的主要原因,我国目前盲人中约有半数是由白内障引起的,而PCO是目前白内障术后最主要的并发症。尽管目前人们不断改进手术技巧以及人工晶状体材料和设计<sup>[2]</sup>,但仍未明显降低PCO的发生率。因此,选择一种安全有效、毒副作用小的药物,对PCO的防治具有重要意义。Mat是豆科植物苦参、苦豆子、广豆根等中草药中的活性成分,有多方面的药理作用和功效,如抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗过敏、抗心律失常、消肿利尿、免疫及生物反应调节作用等<sup>[3-7]</sup>。在前面的研究中,我们发现Mat能有效地抑制RLEC增生,并且随着药物浓度的增加和作用时间的延长,抑制增生的作用也逐渐增强;同时,Mat能降低RLEC内PCNA蛋白的表达,并且其作用呈现明显的剂量-效应关系和时间-效应关系<sup>[8]</sup>。因此,我们通过流式细胞仪检测不同浓度的苦参碱对体外培养的RLEC细胞周期的影响,以探讨Mat抑制RLEC增生的可能机制。结果表明,随着Mat浓度的增加,G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期占细胞周期的比例逐渐增高,S期的比例占细胞周期的比例逐渐降低,增殖指数(PI)亦随着苦参碱浓度的增加而逐渐降低,与对照组及各浓度的Mat组之间相互比较,具有显著性差异(P < 0.05)。提示苦参碱将细胞阻滞在G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期,使细胞不能进入S期进行DNA合成,最终使RLEC的体外增生受到

抑制。细胞增生的调控主要通过抑制G<sub>1</sub>和G<sub>2</sub>期的依赖细胞周期蛋白激酶(cyclins dependent kinases,CDK)的活性,使细胞周期停滞,不进行DNA分裂或已复制的DNA不分裂给予细胞,使细胞增生受到抑制。CDK的活性需要细胞周期蛋白(cyclin)的存在,故cyclin属细胞周期进程的正性调节因子,如cyclin D;而依赖细胞周期蛋白激酶抑制剂(cyclins dependent kinases inhibitor,CKI)则抑制CDK或CDK-cyclin复合物的活性,故CKI属细胞周期进程的负调节因子,如P21,P16和P27。抑癌基因P53,Rb的表达产物也直接或间接抑制细胞周期的进程<sup>[9]</sup>。因此推测Mat阻滞RLECs细胞周期的机制可能与细胞端粒酶的活性受抑<sup>[10,11]</sup>、细胞周期蛋白、CDK和CDKI中各亚基和增生相关癌基因的表达增强或抑制<sup>[12,13]</sup>有关。总之,Mat抑制RLECs增生和阻滞细胞周期的确切作用机制目前尚未明确,开发Mat成为临床防治PCO的药物还有待进一步的研究。

## 参考文献

- 1 姬红培. 后发性白内障的研究进展. 眼科新进展 2007;27(8):635-638
- 2 胡鹏程,袁非. 人工晶状体的材料设计与视觉质量. 眼科新进展 2006;26(10):785-787
- 3 Yamazaki M. The pharmacological studies on matrine and oxymatrine. *Yakugaku Zasshi* 2000;120(10):1025-1033
- 4 Li CQ, Zhu YT, Zhang FX, et al. Anti-HBV effect of liposome-encapsulated matrine *in vitro* and *in vivo*. *WJG* 2005;11(3):426-428
- 5 Zhang JP, Zhang M, Jin C, et al. Matrine inhibits production and actions of fibrogenic cytokines released by mouse peritoneal macrophages. *Acta Pharmacol Sin* 2001;22(8):765-768
- 6 Kobashi S, Takizawa M, Kubo H, et al. Antinociceptive effects of N-acyloctahydroxyrido [3,2,1-ij][1,6] naphthyridine in mice: structure-activity relation study of matrine-type alkaloids part II. *Biol Pharm Bull* 2003;26(3):375-379
- 7 Park JC, Hur JM, Park JG, et al. Inhibitory effects of Korean medicinal plants and camelliatannin H from *Camellia japonica* on human immunodeficiency virus type 1 protease. *Phytother Res* 2002;16(5):422-426
- 8 王智,何湘珍,彭辉灿,等. 苦参碱对体外培养的兔晶状体上皮细胞的影响. 眼科新进展 2007;27(5):353-355
- 9 张军锋,王桂琴,温鸿雁,等. 苦参碱对Hela细胞增殖细胞核抗原表达水平及细胞周期影响的研究. 中国药物与临床 2008;8(3):180-183
- 10 李旭芬,张苏展,郑树,等. 苦参碱对K562细胞端粒酶HTERT-mRNA表达及其酶活性影响作用的研究. 癌症 2001;20(4):391
- 11 张楠,郑广瑛. 端粒酶与年龄相关性白内障的关系. 眼科新进展 2005;25(2):184-186
- 12 张莉萍,蒋纪恺, Tam J. 苦参碱对白血病细胞癌基因和细胞周期调控蛋白表达的影响. 中国肿瘤临床 2001;28(5):347
- 13 司维柯,高利宏,刘斌. 苦参碱诱导人肝癌细胞分化、凋亡时对G<sub>1</sub>细胞周期调节因子的调控. 癌症 2001;20(8):848