

# 贝母素甲对体外培养甲状腺相关眼病患者眼眶成纤维细胞增殖的影响

李 蓓<sup>1</sup>, 郑燕林<sup>2</sup>, 刘文舟<sup>3</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(610051)中国四川省成都市,成都416医院眼科;<sup>2</sup>(610074)中国四川省成都市,成都中医药大学附属医院眼科;<sup>3</sup>(750004)中国宁夏回族自治区银川市,解放军第五医院眼科

作者简介:李蓓,女,博士,主治医师。

通讯作者:李蓓. 9974200@qq. com

收稿日期:2009-11-20 修回日期:2010-01-13

## Influence of the *Fritillaria thunbergii*'s extract on the proliferation of the cultured orbital fibroblasts of TAO-patients

Bei Li<sup>1</sup>, Yan-Lin Zheng<sup>2</sup>, Wen-Zhou Liu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, 416 Hospital, Chengdu 610051, Sichuan Province, China; <sup>2</sup> Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610074, Sichuan Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, the Fifth Hospital of Chinese PLA, Yinchuan 750004, Ningxia Autonomous Hui Region

Correspondence to: Bei Li. Department of Ophthalmology, 416 Hospital, Chengdu 610051, Sichuan Province, China. 9974200@qq. com

Received: 2009-11-20 Accepted: 2010-01-13

### Abstract

• AIM: To observe the influence of the *Fritillaria thunbergii*'s extract on the proliferation of the cultured orbital fibroblasts (OF) of the thyroid-associated ophthalmopathy (TAO)-patients.

• METHODS: The cultured OF of the normal and the TAO-patients was introduced. The *Fritillaria thunbergii*'s extract and the Dexamethasone (Dex) as the positive contrast medicine were divided into different groups to detect the influence of the *Fritillaria thunbergii*'s extract on the proliferation of the cultured OF of the normal and the TAO-patients by the MTT method.

• RESULTS: The *Fritillaria thunbergii*'s extract showed a similar result to Dex in inhibiting the proliferation of cultured OF of the TAO-patients, and both of them showed the dose-dependence. But the inhibition of the *Fritillaria thunbergii*'s extract to the proliferation of the TAO-patients' OF was better than the normal obviously ( $P < 0.05$ ), and the Dex had no this selectivity.

• CONCLUSION: The *Fritillaria thunbergii* inhibit the proliferation of TAO-patients' OF.

• KEYWORDS: *Fritillaria thunbergii* extract; thyroid-associated

ated ophthalmopathy; orbital fibroblasts; proliferation

Li B, Zheng YL, Liu WZ. Influence of the *Fritillaria thunbergii*'s extract on the proliferation of the cultured orbital fibroblasts of TAO-patients. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010; 10 (2): 235-237

### 摘要

目的:观察贝母素甲(PM)对体外培养甲状腺相关眼病患者眼眶成纤维细胞(orbital fibroblast, OF)增殖的影响。

方法:采用体外培养的正常人和甲状腺相关眼病患者的OF,将PM和阳性对照药物地塞米松(Dex)分成不同浓度组,以MTT法检测其对细胞增殖的影响。

结果:对体外培养甲状腺相关眼病患者OF的增殖,PM具有与Dex相似的抑制作用,二者均有明显的剂量依赖性。但PM对甲状腺相关眼病患者OF增殖的抑制作用明显优于正常人( $P < 0.05$ ),而Dex则无此选择性。

结论:浙贝抑制了甲状腺相关眼病患者OF的增殖。

关键词:浙贝提取物;甲状腺相关眼病;眼眶成纤维细胞;增殖

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.02.011

李蓓,郑燕林,刘文舟. 贝母素甲对体外培养甲状腺相关眼病患者眼眶成纤维细胞增殖的影响. 国际眼科杂志 2010; 10 (2): 235-237

### 0 引言

甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)是一种临床上较顽固而且棘手的病症,迄今尚无特效药物能迅速有效地控制,并获一致性的长期缓解。在治疗该病的中药复方中,浙贝是出现频率很高的药物<sup>[1,5]</sup>,但目前尚未见到有实验研究的相关报道,因此我们通过体外培养的眼眶成纤维细胞(orbital fibroblast, OF)中加入浙贝活性成分贝母素甲(PM),以地塞米松(dexamethasone, Dex)为对照药物,采用MTT比色法,观察二者在不同浓度时,对TAO患者及正常人眼眶成纤维细胞(OF)增殖的影响,探讨其作用机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 病例组球后脂肪结缔组织标本来源于核工业416医院眼科行深层眶脂肪切除术的严重TAO患者4例4眼,男1例,女3例;右眼2例,左眼2例;年龄39~56(平均44.5)岁;病程15~48(平均27.5)mo。患者均因严重的暴露性角膜炎、进行性视力减退及无法接受的眼外观而要求行手术治疗。正常对照组来源于2例角膜穿透伤后要求摘除眼球并行义眼植入的患者;年龄33和40岁,男女各1例,均排除其他免疫性和炎症性疾病。贝母

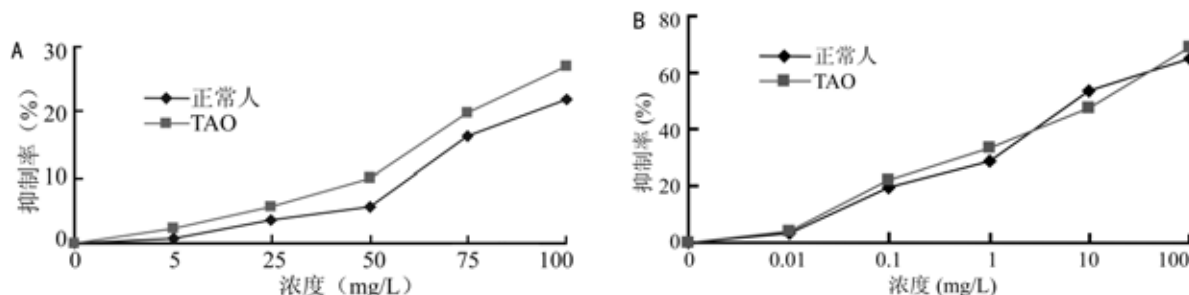


图1 PM和Dex体外对OF的抑制率比较 A:PM;B:Dex。

素甲(PM,中国药品生物制品检定所);地塞米松(dexamethasone,DEX);泗水希尔康制药有限公司;MTT和DMSO(美国Sigma公司);550免疫酶标仪(美国Bio-Rad公司)。PM的配制<sup>[6]</sup>:称取1mg后,加入双蒸水20 $\mu$ L,加入1mol/L HCl溶解,调pH为7.0,并以DMEM液稀释至所需浓度,0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤除菌,分装,4 $^{\circ}$ C保存备用。

**1.2 方法** 利用手术台上取下的眼眶脂肪结缔组织标本,参照郑健堦等<sup>[7]</sup>的方法,采用组织块培养法培养传代,2~4代细胞用于实验。取生长良好的同代TAO及正常人OF,胰酶消化后在细胞计数仪下计数,按 $5 \times 10^3$ /孔接种于96孔板中,并设无细胞空白对照组及无药正常对照组,培养48h后用PBS冲洗各孔3次,改用无血清的DMEM培养液继续培养24h,消除血清对细胞增殖的影响。然后在实验孔中加入含不同浓度PM(5,25,50,75,100mg/L)的培养液,总体积为200 $\mu$ L,每种浓度各设6个复孔,无细胞对照孔及无药对照孔只加培养液。继续培养48h后,弃去各孔上清液,加入20 $\mu$ L(5g/L)MTT继续培养4h,细胞表面形成紫色结晶样的甲臜。再次弃去上清液,加入DMSO 150 $\mu$ L,振荡摇均使甲臜完全溶解,以无细胞空白对照孔调零,酶标仪检测每孔的吸光度A值,以490nm单波检测。细胞生长抑制率(%)=(无药正常对照组A值-实验组A值)/无药正常对照组A值 $\times$ 100%。以同样的方法检测Dex对OF增殖的影响,终浓度为Dex 0.01,0.1,1,10,100mg/L。

统计学分析:采用PEMS 3.0统计学软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正常组与TAO组、PM和Dex对眼眶成纤维细胞干预结果的比较采用校正t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

几种浓度的PM对正常人及TAO患者的OF增殖都有一定的抑制作用,且伴有明显的剂量依赖性。PM对TAO患者OF的抑制作用明显优于正常人,结果具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图1A)。几种浓度的Dex对正常人及TAO患者的OF增殖都有明显的抑制作用,且伴有明显的剂量依赖性。Dex对正常人与TAO患者OF的作用结果无明显差异( $P > 0.05$ ,图1B)。

## 3 讨论

TAO是最常见的眼眶疾病之一,其发病率占眼眶病首位,近年其发病率达1%左右。目前其病因和发病机制尚不完全清楚,病理学研究显示,该病以眼眶脂肪结缔组织和眼外肌体积增加及免疫活性细胞(主要是球后组织淋巴细胞和巨噬细胞)浸润为主要病理特征,亲水性的糖胺聚糖(GAG)和胶原蛋白沉积,后期结缔组织增生并发生纤维化。多数学者倾向于该病是一种与甲状腺疾病相

关的器官特异性的自身免疫性疾病,眶结缔组织和眼外肌束膜的眼眶成纤维细胞(orbital fibroblast,OF)在TAO的发生和发展中起中心作用,既是靶细胞,同时又是效应细胞,表现出多种功能。Dex主要作用为抗炎及免疫抑制作用,用于TAO的治疗已有50多年的历史,取得了一定的疗效<sup>[8]</sup>。既往研究证实Dex可抑制成纤维细胞GAG的合成与释放,同时还可抑制多种细胞因子引起的眼眶成纤维细胞的增殖。但部分应用糖皮质激素疗效欠佳,长期用药会出现多种副作用,激素减量或停药后的复发问题是治疗中的又一难题。

中医<sup>[9-11]</sup>对突眼的认识逐步加深,认为突眼的发生大多与情志变化有关,气滞、痰凝、血瘀为基本病理变化,肝阴不足、气阴两虚为病之根本,病理特点是本虚标实,虚实夹杂,治疗当以活血消瘀、化痰散结为基本治疗原则。

贝母为百合科(Liliaceae),贝母属(Fritillaria)多种植物的干燥鳞茎,为传统中药之一。浙贝载于《本草纲目拾遗》,《百草镜》云:"浙贝出象山,俗称象贝母"。其味苦,性寒,具有清热化痰、散结消肿等功效,系治疗瘰疬痰核之古方"消瘰丸"的主药。浙贝的活性成分较为明确,主要含贝母碱(贝母素甲),去氢贝母碱(贝母素乙),其中贝母素甲(Peimine)是其活性成分之一,属异甾类生物碱中的瑟文类(Cevine groups)生物碱<sup>[12]</sup>。此外,尚含胆碱以及二种中性甾类化合物:前贝母碱(Propeimine)及植物甾醇。现代究其药理作用为:镇咳、祛痰、平喘作用、抗菌作用、镇静、镇痛等多种作用<sup>[13]</sup>。另外,陈泽乃等<sup>[14]</sup>根据4种贝母抑制由血小板活化因子(PAF)诱导血小板聚集的有效部位筛选结果,从平贝母的水溶性活性部位中分得胸苷和腺苷等成分,实验表明腺苷为抑制血小板聚集的主要成分,最近报道腺苷尚能活化白细胞上的A2受体,有效地阻止PAF诱导的白细胞-内皮细胞黏附而参与抗炎过程,提示贝母可能有抗炎作用。之后,张明发等<sup>[15]</sup>首次发现浙贝母具有较强的抗渗出性炎症的作用。抗肿瘤作用研究显示从蒲圻贝母中提取的蒲贝酮碱具有强的抗小鼠艾氏腹水癌(EAS,实体型)、宫颈癌(U14,实体型)及肝癌(HePA,实体型)的活性。鄂北贝母的抗肿瘤实验结果表明,其总生物碱对小鼠移植肝实体瘤具有明显的抑制作用,口服10mg/kg共8d,肿瘤抑制率与相同剂量的5-FU相当,进一步研究表明,其抗肿瘤成分为鄂贝定碱、浙贝素甲和浙贝素乙。

结果提示,PM对体外培养的OF的增殖具有与Dex相似的抑制作用,二者均伴有明显的剂量依赖性,但在我们所选取的浓度范围内,其作用不如Dex强,且对TAO患者OF的抑制作用明显优于正常人,结果具有统计学意义( $P < 0.05$ ),而Dex则无此表现。本实验中,虽然证明了药物的有效性,由于时间关系,药物筛选的具体浓

度均来自于文献报道中,因此,下一步实验可就具体用药浓度进行更为准确的筛选,以指导药物研发。浙贝是中医治疗本病的常用药,但目前尚未见到相关实验报道,别的单味中药用于治疗本病的报道较多,但大多数为临床观察,极少有对其机制的实验研究,故我们采用体外细胞培养的模式,进行中药单味药物的初步筛选,为下一步研究治疗本病的中药复方打下基础,并试图以现代医学的实验方法去诠释古老的传统医学,以获得更多人的理解和认可。

#### 参考文献

- 1 方志平. 中西医结合治疗 60 例 Graves 突眼症的体会. 福建医药杂志 1997;19(2):31
- 2 刘春红. 中西医结合治疗甲亢突眼 36 例总结. 湖南中医杂志 2001;17(3):9
- 3 廖世煌. 甲眼消合并他巴唑治疗甲状腺机能亢进症突眼的临床观察. 中国中西医结合杂志 2000;20(6):433
- 4 孙丰雷,程益春. 消癭片治疗甲状腺机能亢进症的临床及实验研究. 山东中医药大学学报 1998;22(3):206
- 5 方良,刘翠荣. 抗甲突汤治疗甲亢突眼症的临床疗效观察. 中西医结合杂志 1998;18(3):171

- 6 胡凯文,郑洪霞,齐静,等. 浙贝母碱逆转白血病细胞多药耐药的研究. 中华血液学杂志 1999;20(12):650-651
- 7 郑健操,郭彦,张洁,等. 人眼 Tenon 氏囊成纤维细胞的体外培养. 解剖学研究 1999;21(2):96-97
- 8 van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* 1997;9(3):330-337
- 9 傅凤侠,朱社教. 甲状腺机能亢进症从肝论治. 陕西中医 1996;17(2):95
- 10 曹国蓉. 甲状腺机能亢进症的辨证论治. 新中医 1996;28(9):5
- 11 刘清平. 廖世煌辨治甲状腺机能亢进突眼症经验. 浙江中医杂志 2001;1:4
- 12 Kaye SB. Multidrug resistance: clinical relevance in solid tumours and strategies for circumvention. *Curr Opin Oncol* 1998;10(1):15-19
- 13 于晓琳,季晖,王长礼,等. 贝母的药理作用研究概况. 中草药 2000;4:38
- 14 陈泽乃,陆阳,徐佩娟,等. 中药贝母中水溶性成分的研究. 中国中药杂志 1996;21(7):420-422
- 15 张发明,沈雅琴,朱自平,等. 浙贝母的抗炎和抗腹泻作用. 湖南中医药导报 1998;4(10):30-31

#### · 短篇报道 ·

## 利用注射器定位提高玻璃体腔注射 Bevacizumab 的工作效率

高磊<sup>1</sup>, 刘志强<sup>2</sup>, 刘文杰<sup>3</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(264000)中国山东省烟台市,青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院眼科;<sup>2</sup>(264000)中国山东省烟台市,烟台康爱眼科医院;<sup>3</sup>(116044)中国辽宁省大连市,大连医科大学  
作者简介:高磊,男,教授,硕士研究生导师,以第一作者和通讯作者发表 SCI 论文 7 篇,研究方向:玻璃体视网膜及视光学。  
通讯作者:高磊. GL6365@yahoo.com.cn  
收稿日期:2009-10-16 修回日期:2010-01-15

高磊,刘志强,刘文杰. 利用注射器定位提高玻璃体腔注射 Bevacizumab 的工作效率. 国际眼科杂志 2010;10(2):237

### 0 引言

Bevacizumab (Avastin, Genentech Inc, California, USA) 是 2004 年通过美国食品及药物管理局 (FDA) 批准上市的一种重组人 VEGF 单克隆抗体,能竞争性地与内源性血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 受体结合,抑制血管内皮细胞的有丝分裂,从而减少新生血管形成<sup>[1]</sup>。当我们敲入“intravitreal bevacizumab (Avastin)”在 PubMed 进行搜索时会发现 672 篇与之有关的文章,这其中 438 篇(65%)为 2008 年以来所发表的,这说明尽管 bevacizumab 在眼科的使用上存在“Off-Label”等问题,但鉴于其相对低廉的费用、良好的治疗效果和相对的高安全性,玻璃体腔内注射 bevacizumab 仍然得到国际眼科界的普遍认可。由于“Off-Label”问题,目前国内眼科所使用的 bevacizumab 多为 100mg (4mL) 规格,如果以目前大家公认的单次玻璃体腔内注射的最高剂量 2.5mg 来计算,理论上一瓶药可以同时满足 40 例的注射,因此,为了减轻患者的经济负担,往往采取群体注射。考虑到玻璃体腔注药本身操作时间非常短暂,因此如何在符合诊疗操

作规范的前提下提高工作效率就显得尤为必要,其中用于注射部位测距用的圆规或标尺无疑是制约工作进程的重要瓶颈,因为很少有眼科机构能够具备满足群体玻璃体腔内注射流畅进行所需要的圆规或标尺数量,为此我们利用 1mL 注射器很好的解决了上述问题。

### 1 临床资料

我们 2007-05/2009-12-30 采用下述方法分 33 批实施玻璃体腔内注射 486 例,单批注射人数 8~18 例,除 9 例注射部位结膜下出血外,未有任何并发症发生,整个手术操作没有因为穿刺定位而发生中途暂停。术前准备:首先用 5mL 注射器一次抽吸足够的 Bevacizumab,根据患者数量,准备 2 倍于患者数量的 1mL 注射器并去除针头,将药液由 5mL 注射器经锥头分别注入 1mL 注射器,安装针头后排除药液内气体,保留 0.1mL 药液备用。玻璃体腔内注射:常规消毒铺无菌洞巾,开睑器开睑,利用不含药液的注射器锥头末端于颞下象限紧贴角膜缘并垂直于眼球壁,轻压数秒,即可在球壁形成一最大直径与锥头末端直径相吻合的压痕,选择距离角膜缘最远压痕处作为穿刺注射部位进行玻璃体腔内注射。

### 2 讨论

从整个玻璃体腔内注射操作流程来看,即便借助快速高压消毒对所需器械进行消毒周转,由于一般医疗单位圆规或标尺的数量限制,定位穿刺无疑是有可能导致群体注射不能流畅进行的最主要瓶颈。锥头系指注射器顶端接纳注射针头的突出部分,根据我国国家标准,所有注射器的锥头末端的标准直径为 3.925mm (GB/T 1962.1-2001),而这个距离恰好是我们进行玻璃体腔穿刺部位定位所需,根据我们的临床实践,该方法完全可以满足玻璃体腔内注射穿刺点距离角膜缘后 3.5~4mm 的要求,它不仅具有满足测量、无菌和成本低廉的优势,最大的优势在于提高群体玻璃体腔内注射的工作效率,同时注射前短暂的锥头压迫,对降低眼内压或许还具有一定的作用。

#### 参考文献

- 1 Senger DR, Water L, Brown LF, et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metasta Rev* 1993;12:303-324