维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0037-03

MTT法检测羟基喜树碱对兔晶体上皮细胞生长的作用

罗莉霞[1]，李平华[1]，彭　惠[1]，骆云鹏[2]，汤为学[2]

（1.重庆医科大学临床学院眼科　重庆　400016；2.重庆医科大学病理生理教研室　重庆　400016）

【摘　要】目的：检测羟基喜树碱(Hydroxycamptothecine，HCPT)对体外培养的兔晶体上皮细胞（rabbit lens epithelial cells，RLECs）增殖的影响。方法：取2～3代的RLECs在96孔板中培养24h后，用不同浓度的HCPT分别作用24及72h，用甲基噻唑基四唑（Methyl thiazolyl tetrazolium，MTT）测定法观察HCPT对RLECs增殖及贴壁的影响。结果：HCPT既能抑制RLECs的增殖，还可抑制RLECs的贴壁，24h的半数抑制量（IC_{50}）为96.041 μg/ml，72h的IC_{50}为1.34 μg/ml。结论：一定浓度的HCPT能有效抑制RLECs的生长。

【关键词】晶体上皮细胞；羟基喜树碱；MTT测定法

【中国图书分类法分类号】R776.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000-06-05

Effect of Hydroxycamptothecine on rabbit lens epithelial cells by MTT assay

LUO Li-xia, et al

(Department of Ophthalmology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the inhibition of Hydroxycamptothecine (HCPT) on rabbit lens epithelial cells(RLECs) proliferation in vitro. *Methods*: The RLECs of the second and the third passage were placed in 96-well tissue culture plates and incubated for 24 hours, then exposed to different concentrations of HCPT for 24 and 72 hours. Determined by MTT colorimetric assay. *Results*: We found that HCPT could inhibit both the growth of RLECs and the attachment of RLECs. The IC_{50} of HCPT exposed to RLECs for 24 hours and 72 hours were 96.041 μg /ml and 1.34 μg/ml. *Conclusion:* The growth of RLECs can be effectively inhibited by HCPT.

【Key words】 *Lens epithelial cells; Hydroxycamptothecine; MTT colorimetric assay*

白内障囊外摘除及人工晶体植入术后，继发性后囊膜混浊（后发性白内障）是影响术后视功能恢复的主要并发症之一。后囊膜混浊形成的主要原因[1]为：残留晶体上皮细胞增生、迁徙及胶原和基底膜样物质的形成。因此，研究抑制晶体上皮细胞的增殖，对后发性白内障的预防和白内障术后疗效的提高有重大的意义。国内外已有关于药物抑制晶体上皮细胞增殖的实验研究，但尚未见HCPT应用于抑制晶体上皮细胞的报道，本研究旨在探讨HCPT对RLECs增殖的影响，为临床上白内障术后后囊膜混浊的预防，提供实验依据。本研究还探讨了较难培养的原代RLECs的改良方法，为需要培养RLECs的实验提供一种简便易行的途径。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　动物及试剂　2～3月龄新西兰白色家兔（重庆医科大学实验动物中心提供）60只，体重1～1.5kg，无眼疾，雌雄兼用。羟基喜树碱（天诚药业有限公司）；小牛血清,胎牛血清（杭州四季青生物工程有限公司）；DMEM/F12 (Gibco、美国)；MTT(Sigma，美国)；胰蛋白酶(Gibco，美国)。

1.1.2　器材　自动酶标光度仪(BIO-RAd 2550型，美国)；96孔酶标板(NUNC，丹麦)；细胞培养瓶(NUNC，丹麦)。倒置显微镜(Nikon，日本)；离心机(LXJ-Ⅱ，上海)；微量振荡器（WZ-ZA，北京）

1.2　方法

1.2.1　RLECs的培养　耳缘静脉注射空气处死家兔，常规无菌操作摘出眼球，沿角膜缘剪开以暴露晶状体，在显微镜下完整摘出晶体，并仔细清除晶体周围残存的悬韧带。用显微无齿镊沿赤道部撕下晶体前囊膜，放入盛有1～2滴完全培养液的表面皿中，将前囊膜剪至约0.5～1mm^2大小的碎片，用吸管将其均匀移入50ml的培养瓶底面，并加入完全培养液5ml，（将囊膜碎片分别放入含15%小牛血清的DMEM/F12和含15%胎牛血清的DMEM/F12的塑料培养瓶及玻璃培养瓶进行培养），放进37℃、含5%CO_2、饱和湿度的孵箱内，瓶底向上静置3～4h待上皮贴壁后，翻转培养瓶继续培养。根据细胞生长情况更换培养液。一般一周后每隔3天换一次液，待培养细胞接近铺满时，用0.25%的胰蛋白酶消化3min，分

作者介绍：罗莉霞（1970-　），女，硕士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

散、洗涤后，按1：2比例传代培养。在倒置显微镜下观察细胞的生长情况和形态。

1.2.2 MTT法测定HCPT对RLECs的作用　取培养的第2～3代呈对数生长期的RLECs，用0.25%的胰蛋白酶消化3～5min，台盼蓝染色、计算活细胞数，调整细胞浓度至5×10^4个/ml，并将细胞悬液接种于96孔培养板，每孔200μl，置CO_2孵箱中培养24h。待细胞贴壁后，加入用生理盐水稀释的HCPT 20μl，令终浓度分别为0.375μg/ml、0.750μg/ml、1.5μg/ml、3.0μg/ml、和6.0μg/ml。每一药物剂量设置9平行孔，同时设置9孔试剂对照组及9孔细胞对照组。加入上述浓度的HCPT后，分别继续培养24h和72h。取出、弃上清液，加入20μl的MTT和200μl无血清培养液，放入孵箱中再培养4h。取出离心(800rpm)5min，去除上清液，每孔加二甲亚砜200μl，微量振荡器上振摇5min，用全自动酶标光度仪进行比色，波长600nm，测出每孔吸光度值A。

1.2.3 MTT法测定HCPT对RLECs贴壁的影响　将培养的2～3代RLECs以5×10^4个/ml浓度接种于24孔板后，加入终浓度为0.375μg/ml的HCPT即小于十分之一24h IC50。作用24h后将原培养液及未贴壁细胞吸掉，加无血清培养液200μl和MTT20μl，继续培养4h后取出，吸去上清液，加二甲亚砜200μl，震荡后比色，波长600nm，用A值来表示贴壁的细胞量。

1.3 统计学方法

所有数据用SAS软件包处理，以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用t检验。用药组分别与对照组比较，显著性标准为$P<0.05$。

2 结　果

2.1 晶体上皮细胞的生长及形态

在含15%小牛血清的DMEM/F12培养液RLECs生长缓慢，且稀疏、量少，无法用台盼兰计数；而在含15%胎牛血清的培养液中RLECs生长良好，呈片状铺砌，细胞量多。在玻璃瓶中的RLECs贴壁不好，多呈岛状浮于培养液面而死亡；RLECs在塑料瓶中易贴壁，倒置显微镜下观察(如图1)：细胞保持上皮特征。



图1　原代培养6天的兔晶体上皮细胞(倒置显微镜，×200)

2.2 HCPT对RLECs增殖的影响

HCPT对RLECs增殖的影响如表1。MTT法显色深浅随板孔中细胞数增加而逐渐加深，其吸光值A亦随之升高。结果显示HCPT能抑制RLECs增殖，且随药物浓度的增加及作用时间的延长，抑制作用增强。

2.3 HCPT对RLECs贴壁的影响　将0.375μg/ml的HCPT作用于RLECs，结果显示该药对RLECs贴壁有抑制作用($P<0.05$)。见表2。

Table 1 Effects of HCPT on the proliferation of RLECs

Groups	A * $\bar{x}\pm s$	t	P	A ** $\bar{x}\pm s$	t	P
Control	0.309±0.010			0.369±0.080		
HCPT(μg/ml)						
0.375	0.281±0.023	1.962	>0.05	0.211±0.015	16.527	<0.05
0.75	0.280±0.010	3.499	<0.05	0.190±0.035	35.408	<0.05
1.5	0.264±0.061	6.628	<0.05	0.180±0.009	26.312	<0.05
3.0	0.249±0.018	4.986	<0.05	0.169±0.002	41.804	<0.05
6.0	0.234±0.011	8.566	<0.05	0.163±0.009	29.068	<0.05

* 24 hours HCPT exposure; ** 72 hours HCPT exposure

Table 2 Effects of HCPT on the attachment of RLECs

Group	A $\bar{x}\pm s$	rate of the attachment%	t	P
Control	0.677±0.044	100		
HCPT(ug/ml)	0.547±0.054	80.79	3.191	<0.05

3 讨　论

3.1 体外培养RLECs的体会

晶体对外界因素的反应几乎全部依赖于晶体上

维普资讯 http://www.cqvip.com

皮细胞，因晶体悬浮于房水中，使我们较易得到纯净的晶体上皮细胞[1]。鉴于此，在后发性白内障预防的探索中，培养晶体上皮细胞以观察对其有关生理、生化及药物抑制等方面的研究。1982年，Reddan介绍了胰酶消化法培养RLECs[2]，其操作不易掌握。本实验在组织块培养方法[3]基础上，加以改进，简便易行。实验发现：(1)采用玻璃培养瓶，RLECs贴壁不好，重复性较差；而将晶体囊膜碎片接种于塑料培养瓶中，细胞贴壁牢固，重复性高，可获得满意的细胞量。(2)用胎牛血清培养的RLECs比用小牛血清的要生长得旺盛，可缩短传代时间，在加胎牛血清的培养液中生长的RLECs，原代7～8天即铺满瓶底，且细胞量多；而生长在加小牛血清的培养液中的则需10～15天，且细胞量少。倒置显微镜下观察见RLECs呈多边形上皮样细胞（见图1）。

3.2 MTT法测定HCPT对RLECs的作用

MTT法[4]是一种简便、准确、快速的测定细胞增殖与抑制的方法，其原理为活细胞对可溶性MTT可产生一种不溶性的蓝紫色结晶产物，其量与活细胞数正比。将其溶解在有机溶剂里，于一定波长范围内，通过比色分析以反映成活细胞数变化。MTT浓度为5mg/ml时，反应4h可获得满意的A值。显色后宜在30min内完成比色，此时稳定性较佳。

本实验选用的新型抗癌药HCPT，其作用靶是拓扑异构酶I(Topo I)，它通过促使细胞DNA的降解而发挥细胞毒作用。Topo I正常功能是使超螺旋的DNA双链解旋，直接参与或影响DNA复制、修复或转录过程，影响细胞生长。HCPT能抑制Topo I的功能，使DNA不能复制而导致细胞死亡。迄今，国内外尚未见报道该药对晶体上皮细胞作用的研究。本实验采用MTT法检测HCPT对体外RLECs增殖的影响。其结果显示：HCPT对培养的RLECs的增殖有明显的抑制作用，且呈浓度依赖性和时间依赖性。HCPT对培养的RLECs作用24h和作用72h的IC_{50}分别为96.041 μg/ml和1.34 μg/ml，二者具有显著性差异（$P<0.05$）。即该药持续作用对RLECs抑制作用好，而不宜采用短时作用方法。

临床发现白内障囊外摘除术后，残留的晶体上皮细胞粘贴于后囊膜、继而增殖，最终形成后发性白内障。为了解HCPT对细胞粘附、贴壁的影响，将一定浓度的细胞悬液加入96孔板后 立即在细胞贴壁前加入HCPT，观察RLECs贴壁的情况。选择对RLECs无杀伤作用的小于十分之一24h IC_{50}[5]，便于观察其对细胞贴壁率的影响。

本研究发现HCPT既能抑制兔晶体上皮细胞增殖，又能抑制其贴壁，从而影响细胞生长。所以我们认为HCPT对预防后发性白内障的形成有较大的研究价值。

参 考 文 献

[1] Rleiman NJ.Hydrogen peroxide-induced DNA damage in bovine lens epithelial cells[J]. Mutation Research,1989;240(1):35-48.

[2] Reddan JR,Deiedzic DC,Mostafapour MK.et al.Establish and characterization of a lens epithelial cell line from an eight year old rabbit[J]. Eye Res .1983;2(9):633-636.

[3] 苏小波，李绍珍，郑建梁. 兔晶体上皮细胞培养的技术改进[J]. 眼科研究，1996;14(4):266-267.

[4] 骆云鹏，殷玉炳，汤为学，等. 抗癌药物敏感实验（MTT法）在结直肠化疗中的实验与临床研究的应用[J]. 中国医药荟萃，1991;89-92.

[5] 徐叔云，卞如濂，陈 修. 药理实验方法学[M]. 第一版，北京：人民卫生出版社，1982;406-407.