维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0025-04

顺铂、米托蒽醌及阿糖胞苷对兔晶体上皮细胞的作用

彭 惠[1]，李平华[1]，罗莉霞[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. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室 重庆 400016）

【摘 要】目的：研究顺铂(Cisplatin，PDD)，米托蒽醌(Mitoxantrone，Mit)，阿糖胞苷(Cytosine Arabinoside，Ara-C)对兔晶体上皮细胞（rabbit lens epithelial cells，RLECs）增殖的抑制作用。方法：分离兔晶体囊膜行组织细胞培养，传代的2～3代RLECs在96孔板培养24h，然后用不同浓度的PDD、Mit及Ara-c作用细胞24h及72h，用MTT（methyl thiazolyl tetrazolium）比色法进行测定。电镜观察细胞超微结构，流式细胞仪观察细胞周期的变化。结果：PDD及Mit作用于传代培养RLECs 24h IC_{50}分别为38.92 μg/ml、8.92 μg/ml；72h的IC_{50}分别为6.71 μg/ml、2.04 μg/ml。结论：PDD及Mit均为剂量依赖型和时间依赖型药物，均能有效抑制兔晶体上皮细胞的生长，在此试验条件下Ara-C对兔晶体上皮细胞增殖无明显抑制作用。

【关键词】兔晶体上皮细胞；抑制；顺铂；米托蒽醌；阿糖胞苷

【中国图书分类法分类号】R776.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-05-11

Effect of Cisplatin , Mitoxantrone and Cytosine Arabinoside on rabbit lens epithelial cells

PENG Hui, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the ability of Cisplatin, Mitoxantrone and Cytosine Arabinoside on inhibiting the proliferation of rabbit lens epithelial cells(RLECs). *Methods*: Lens epithelium was isolated and cultured, and 2~3 passage RLECs were placed in 96-well flat bottomed tissue culture plates and incubated for 24 hours, then exposed to different concentrations of Cisplatin, Mitoxantrone and Cytosine Arabinoside for 24 and 72 hours and the effect of RLECs were measured with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The apoptosis of cells were observed with transmission electron microscope (TEM) .The changes of cell period were observed with flow cytometer (FCM). *Results*: The IC_{50} of cisplatin and mitoxantrone exposed to RLECs for 24 hours were 38.92 μg/ml、8.92 μg/ml and those of 72 hour were 6.71 μg/ml、2.04 μg/ml respectively. *Conclusion*: Cisplatin and Mitoxantrone were dose- dependent and time-dependent inhibitors. Both of them inhibited the proliferation of RLECs effectively , Cytosine Arabinoside, however, had no obvious effect on RLECs in this experimental condition.

【Key words】Rabbit lens epithelial cells; Inhibition; Cisplatin; Mitoxantrone; Cytosine Arabinoside

白内障囊外摘除术后晶体后囊的混浊（后发性白内障）是影响视功能恢复的主要并发症之一。国内外研究资料表明，残留的晶体上皮细胞增殖是形成后囊混浊的主要原因[1,2]。对后囊混浊的预防，目前尚无一种安全、有效的方法。我们通过体外兔晶体上皮细胞的培养（rabbit lens epithelial cells，RLECs），观察顺铂（Cisplatin，PDD）、米托蒽醌（Mitoxantrone，Mit）及阿糖胞苷（Cytosine Arabinoside，Ara-C）对RLECs生长的抑制，为预防后发性白内障提供实验依据。

作者介绍：彭 惠（1967- ），女，主治医师，硕士生

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康新西兰白色家兔，雌雄兼用，兔龄2～3月，体重1.8～2.4kg。由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂及仪器

培养基为DMEM＋F12(美GIBCO)，加入20％胎牛血清（杭州四季清生物工程材料有限公司），青霉素（100U/ml）、链霉素（100 U/ml），pH值为7.2～7.4。

四甲基偶氮唑盐（MTT，Fluka），用PBS配成5mg/ml的溶液，除菌待用。PDD（齐鲁制药厂生产）；Mit（升和制药）；Ara-C（上海华联制药有限公司提供）。二甲基亚砜（苏州正兴化工研究所生产）。96孔培养板(美Corning)，微量振荡器WZ-ZA型(北京海淀电子医疗仪器厂生产)。自动酶

维普资讯 http://www.cqvip.com

标读数仪(E_{25m}型，美Bio-Rad)，倒置显微镜(Nikon日本)。细胞培养恒温箱（日本池本理化工业株式会社），超净工作台（苏州净化设备厂）。

1.3　实验步骤

1.3.1　兔晶体上皮细胞的培养[3]

采用新鲜兔眼，清除眼球周围组织，浸入75%酒精消毒后，用PBS（磷酸盐缓冲液）冲洗2次，置于超净工作台上，剪开角膜，分离晶体前囊膜，放入滴有培养液的玻璃皿中，剪碎后用巴氏吸管转移至50ml塑料培养瓶底面，使其涂布均匀。并加入4～5ml培养液倒置于37℃含7%CO_2饱和湿度的培养箱内培养3～4h，待上皮贴壁后翻转培养瓶进行培养。至细胞从囊膜周边移出后视生长情况再适时换液，一般5～7天后可换液一次。细胞增殖至大片汇合及接近大片汇合时，可用0.25%胰蛋白酶消化后按1：2的比例传代培养。

1.3.2　用四甲基偶氮唑盐（methyl thiazolyl tetrazolium，MTT）测定法检测药物对兔晶体上皮细胞增殖的影响

以5×10^4/ml和1×10^5/ml细胞浓度的200μl细胞悬液接种于96孔培养板中，并置于37℃含7%CO_2饱和湿度的培养箱内培养24h后，加入不同浓度的PDD、Mit及Ara-C，其终浓度PDD为2.5、5、10、20、40μg/ml，Mit为0.5、1、2、4、8μg/ml，Ara-C为25、50、100、200、400μg/ml，再分别培养24h和72h，加入20μl MTT试剂，培养4h，吸去培养液，加入200μl二甲基亚砜溶液，室温下微量振荡器振荡5min，自动酶标读数仪比色(波长600nm)。检测不同浓度PDD、Mit及Ara-C对细胞增殖的影响。

1.3.3　正常兔晶体上皮细胞及PDD、Mit作用后的兔晶体上皮细胞超微结构的观察

用2～3代已汇合的兔晶体上皮细胞，用0.25%胰蛋白酶消化计数为1×10^6/ml，加入1ml离心管中用PBS液洗两次，弃其上清液后，立即加入戊二醛，行电镜观察正常兔晶体上皮细胞、PDD(10μg/ml)和Mit（2μg/ml）作用24h后兔晶体上皮细胞的超微结构。

1.3.4　流式细胞仪观察细胞周期的变化

先制成2×10^6/ml细胞悬液，设正常对照和分别加入PDD(10μg/ml)及Mit（2μg/ml）培养24h的药物组。消化后，用PBS液洗两次，离心弃其上清液后，轻轻打匀细胞，用75%乙醇（1～2ml）固定，行流式细胞仪分析。

1.4　统计学方法

每份标本平行测定6孔，求其平均值($\bar{x}\pm s$)，采用SAS软件方差分析，q检验，每个药物试验组与正常对照组比较。

2　结　果

2.1　米托蒽醌和顺铂对兔晶体上皮细胞的影响

Mit及PDD均呈现剂量依赖型和时间依赖型，Ara-C各药物浓度组经统计学分析对RLEC无抑制作用。IC_{50}：24h PDD为38.92μg/ml，Mit为8.92μg/ml，$P<0.05$；72h PDD为6.71μg/ml，Mit为2.04μg/ml，$P<0.05$，见表1。

2.2　光镜观察

2.3　超微结构观察结果

表1　MTT法测定米托蒽醌、顺铂对兔晶体上皮细胞的作用

组别	24h				72h			
	吸光度(A值)	抑制效应(%)	F	P	吸光度(A值)	抑制效应(%)	F	P
对照组	0.657±0.047		18.91	0.0006	0.925±0.089		8.38	0.0004
米托蒽醌组(μg/ml)								
0.5	0.534±0.02	18.7			0.906±0.008	2.00		
1	0.521±0.037	20.7			0.649±0.085	29.8		
2	0.514±0.015	21.8			0.518±0.097*	44.0		
4	0.494±0.076*	24.8			0.233±0.015*	74.8		
8	0.329±0.011*	49.9			0.225±0.024*	75.7		
对照组	0.538±0.079		4.80	0.0005	0.925±0.089		17.1	0.0001
顺铂(μg/ml)								
2.5	0.528±0.090	1.90			0.869±0.047	6.10		
5	0.496±0.024	7.80			0.737±0.093	20.3		
10	0.402±0.044	25.3			0.474±0.068*	48.8		
20	0.316±0.081*	41.3			0.133±0.024*	85.6		
40	0.275±0.045*	48.9			0.096±0.011*	89.6		

注：* 与对照组比较$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

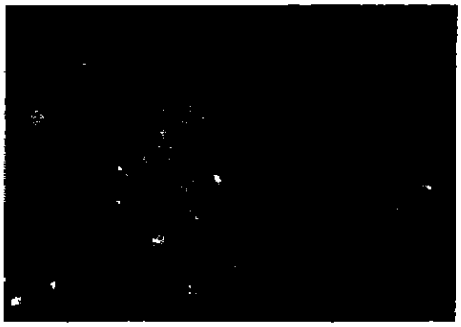


图1 第二代RLECs互相汇合形成“拉网现象”。（×400）



图2 正常RLECs电镜照片，细胞表面有微绒毛，细胞器丰富，核形态不很规则，常染色质多，异染色质少，细胞生长活跃。（×5000）



图3 药物PDD(10μg/ml)作用24h后可见明显的凋落小体（×15000）

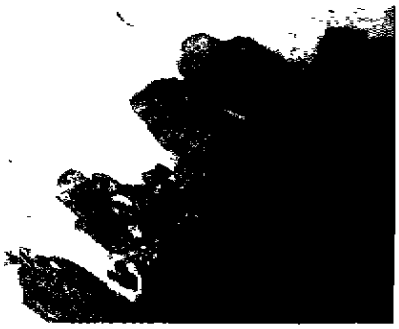


图4 药物Mit（2μg/ml）作用24h后可见凋亡现象（×12000）

2.4 流式细胞仪检查

表2 正常及各药物作用24h对RLECs周期的变化

图号	G_0-G_1	G_2-M	S
5（正常）	57.78	11.77	30.44
6（Mit）	73.26	12.06	14.68
7（PDD）	77.53	12.06	10.41

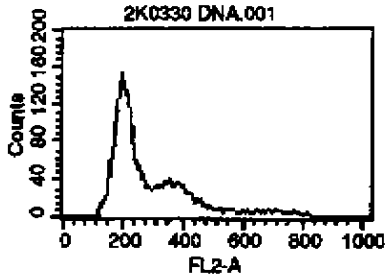


图5 正常对照的流式细胞仪分析图

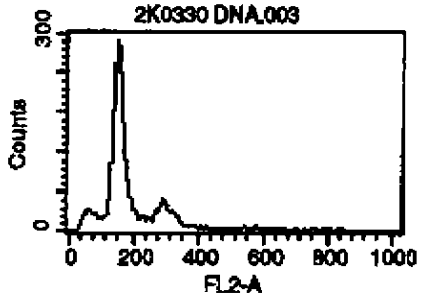


图6 Mit（2μg/ml）作用RLECs 24h的流式细胞仪图，S期细胞减少，出现凋亡峰（第一个峰）

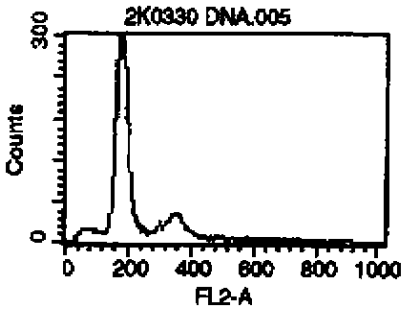


图7 PDD(10μg/ml) 作用RLECs 24h的流式细胞仪图，S期细胞减少，出现凋亡峰（第一个峰）

3 讨 论

体外晶体上皮细胞培养对研究白内障和后囊混浊（后发性白内障）形成机理及其防治都有十分重要的价值。组织病理学研究已证实，后囊混浊主要是由残留晶体上皮细胞的移行、增殖和纤维化所致[4]。Yamamoto等及McDonnell等观察抗代谢药物对体外培养的动物晶体上皮细胞增殖的抑制作用，发现5-Fu和氨甲喋呤可有效地抑制兔晶体上皮细胞的增殖与移行[5,6]。

Mit是带有氨基的蒽醌类化合物，为一种广谱的细胞毒类药物，进入细胞后主要聚集胞核，靶目标系DNA和RNA。Mit系非细胞周期特异性药物，在体外毫微克级的浓度即可抑制细胞增殖，亚毫克

维普资讯 http://www.cqvip.com

级浓度可使CHO、FL、SCG-7901等细胞株克隆形成能力明显下降；PDD是一种广谱抗肿瘤药物，主要通过交叉连结与DNA紧密结合而抑制肿瘤细胞RNA及蛋白质合成，属细胞周期非特异药物。Ara-C为细胞周期特异性药物，作用于S期，并对G/S、S/G_2边界有延缓作用[7]。

晶体上皮细胞的指数生长期位于传代后的48h至6天，我们在实验中将兔晶体上皮细胞加入96孔板中培养24h后加药细胞不倍增，细胞浓度未变，实验的可比性好。研究结果显示，Mit对培养的兔晶体上皮细胞24h半效量为8.92 μg/ml，作用72h为2.04 μg/ml，PDD作用24h为38.92 μg/ml，72h为6.71 μg/ml，即作用时间越长，抑制作用越明显。电镜也观察到药物作用后细胞出现凋亡现象，流式细胞仪检查可见G_0-G_1期细胞明显增多，S期细胞明显减少，并出现凋亡峰，细胞周期的变化说明细胞活跃程度降低。而Ara-C对兔晶体上皮细胞无明显抑制作用，此情况与药物作用不同的细胞类型及作用细胞一、两个时间点有关，有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Harding JJ. Cataract :Biochemistry, Epidemiology and Pharmacology[M]. Chapman and Hall. London.1991;83-124.

[2] Apple DJ. Solomon KD. Tetz MR. et al. Posterior Capsule Opacification[J]. Surv Ophthalmol.1992;37:73-116.

[3] 郭海科、李绍珍，曹心媛，等. 人类晶体上皮细胞培养及其生长抑制的实验研究[J]. 中华眼科杂志，1995;31:102-104.

[4] Ohara k.Itakura k, Ibaraki N. Anterior Capsule Opacification :a cell culture model[J]. Acta Ophthalmol ,1992;(S) 205:29-33.

[5] Yamaoto T. Soong HK.Lichter PR. Effects of 5-fluorouracil on cultured rabbit lens epithelial cells[J]. Jpn J Ophthalmol. 1990;34:325-328.

[6] McDonndl PJ. Zarbin MA. Green WR. Posterior capsule opacification in pseudophakic eyes[J]. Ophthalmology. 1983;90:1548-1551.

[7] McDonndl PJ. Krause W. Glaser BM. In vitro inhibition of lens epithelial cell proliferation and migration[J]. Ophthalmic Surg. 1988;19:25-29.

（上接第24页）

使CⅣ合成增加。(3)糖基化终末产物(AGEs)的作用。DM时AGEs产生增加，与系膜细胞上特异性受体结合后，能增加细胞外基质的产生，还能与一些胶原蛋白发生交联，使胶原降解减慢。Striker等用PCR方法研究发现，正常成年鼠注射AGEs后，肾小球CⅣ及其基因表达增加，说明AGEs可诱导CⅣ合成[7]。第二是细胞因子的作用。以转化生长因子-β1（TGF-β1）的作用最为突出，研究表明DM状态肾基底膜TGF-β1表达增加，可刺激CⅣ合成，同时TGF-β1增加CⅣ降解酶抑制物活性，抑制CⅣ降解酶合成而减少细胞外CⅣ的降解[8]。

本研究认为，2型DM病人尿CⅣ水平可显示基底膜中生化成分及结构的变化，反映肾脏损害程度，可用来早期诊断DN，监测DN的发生发展。

参 考 文 献

[1] Iijima T. Suzuki S.Sekizuka K. Follow-up study on type Ⅳ collagen in patients with early stage diabetic nephropathy[J]. J Clin Lab Anal. 1998;12(6):378-382.

[2] Banu N. Hitoshi H. Kataoka S. et al. A novel method for concentration urinary type Ⅳ collagen based on precipitation with polyethylene glycol:Application to its measurement by enzyme immunoassay[J] . Ann Clin Biochem ,1994;31:485-491.

[3] Kotajima N. Fukumura Y. Obata K.et al . The significance of determination of urinary type Ⅳ collagen concentrations from a random urine collection in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus [J]. Rinsho Byori. 1998:46(930):277-282.

[4] Gilbert RE. Cox A.Leonard L.et al .Expression of transforming growth factor- β and type Ⅳ collagen in the tubulointerstitium in experimental diabetes[J]. Diabetes. 1998;47(3): 414-422.

[5] Sumida Y. Uqa H. Yano Y. Abnormal metabolism of tyep Ⅳ collagen in normotensive NIDDM patients[J].Hormone Research. 1997;48(1):23-28.

[6] Jones SC. Saunders HJ. Qi W. Intermittent high glucose enhances cell growth and collagen synthesis in cultured human tubuinterstitial calls[J]. Diabetologia. 1999;42 (9):1113-1119.

[7] Striker LJ. Striker GE. Administration of AGEs in vivo induces extracelular matrix gene experession[J] Nephrol Dial Transplant. 1996;15(s):52-65.

[8] Gambaro G. Baggio B. Growth factors and the kidney in diabetes mellitus[J].Critical Review in Clin Lab Sci. 1998;35(2):117-151.