DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.015
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003


文章编号:1000-5404(2003)05-0407-03

论著

# 羊膜对培养的人视网膜色素上皮细胞增殖影响的实验研究

李世洋,王 一 (第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038)

提 要:目的 观察羊膜是否对视网膜色素上皮细胞(Retinal pigment epithelial, RPE)的生长有影响,探讨羊膜用于治疗增殖性玻璃体视网膜病变(Proliferative vitreoretinopathy, PVR)的潜在可能性。方法 运用MTT比色法,观察羊膜匀浆在不同浓度(40、80、160 μg/ml)及不同作用时相点(24、48、96 h)对人RPE增殖的影响。结果 ①在第24小时,3个浓度羊膜匀浆均对人RPE增殖起抑制作用,而且随浓度增加抑制作用减弱,抑制率(50.774%、27.387%、14.802%)间相差显著($P<0.05$);在第48、96小时,羊膜匀浆在低浓度时,对人RPE增殖起抑制作用,而在中、高浓度为促增殖作用,其中在第48小时抑制率(4.494%、-0.944%、-3.693%)间相差不显著($P>0.05$),在第96小时时抑制率(8.388%、-9.425%、-17.651%)间相差显著($P<0.05$)。②羊膜匀浆浓度为40 μg/ml,各时相点对人RPE均为抑制增殖,抑制率间相差非常显著($P<0.01$);在浓度为80 μg/ml、160 μg/ml时,随着作用时间延长,羊膜匀浆对人RPE增殖的作用逐渐由抑制变为促进作用,抑制率间相差显著($P<0.05$)。结论 羊膜匀浆在低浓度,短时间内对人RPE增殖有抑制作用,而在高浓度、长时间则对RPE增殖有促进作用。羊膜匀浆用于临床治疗PVR的可能性不大。

关键词:羊膜;视网膜色素上皮细胞;增殖
中图法分类号:R318.08; R339.146; R329.28 文献标识码:A

# An experimental study of the effects of human amniotic membrane on human retinal pigment epithelial cell proliferation *in vitro*

LI Shi-yang, Wang Yi (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To observe the effects of human amniotic membrane (HAM) on human retinal pigment epithelial (HRPE) cells proliferation so as to find a new treatment method for proliferative vitreoretinopathy (PVR). Methods We observed the effects of supernatant of homogenized fresh amnion (SHFA) of different concentrations on HRPE cells proliferation at different time points by tetrazotium (MTT) colorimetric assay. Results (1) The proliferation of HRPE cells was inhibited at 24 h after being cultured with SHFA. The effect of inhibition decreased with the increasing concentration of SHFA in DME/Ham's F12 (D/F12). There was significant difference of inhibition rate among the groups (50.774%, 27.387% and 14.802%) ($P<0.05$). At 48 and 96 hours after culture, the proliferation of HRPE cells was inhibited in 40 μg/ml groups, but could be promoted in 80 μg/ml and 160 μg/ml groups. However, there was no significant difference of inhibition rate among the groups (4.494%, −0.944% and −3.693%) ($P>0.05$). At 96 hours after culture, the difference of inhibition rate among the groups (8.388%, −9.425% and −17.651%) was significant ($P<0.05$). (2) In 40 μg/ml concentration group, the proliferation of HRPE cells was inhibited at 24 h, 48 h and 96 h after culture. The difference of the inhibition rate between 24 h and 48 h, between 24 h and 96 h was significant ($P<0.01$). In 80 μg/ml and 160 μg/ml groups, the proliferation of HRPE cells was inhibited at 24 h, but promoted at 48 h, 96 h after culture. The difference of the inhibition rate between 24 h and 96 h ($P<0.01$), between 24 h and 48 h ($P<0.05$) was significant. Conclusion The proliferation of HRPE cells can be inhibited by SHFA of lower concentration (40 μg/ml) within shorter period (24 h), but be promoted by SHFA of higher concentration (80 μg/ml, 160 μg/ml) within longer period (48 h ~ 96 h), suggesting there is little possibility that PVR can be treated with SHFA.

**Key words:** human amniotic membrane; proliferation; human retinal pigment epithelial

增殖性玻璃体视网膜病变(Proliferative vitreoretinopathy, PVR)是孔源性视网膜脱离手术失败的主要原因[1,2]。对其治疗目前尚无一种有效药物在临床上获得应用[3,4]。羊膜作为一种理想的生物材料,目前已成功地应用于眼表结构重建[5~11]。羊膜在眼表重建中表现出抑制成纤维细胞增生、减少血管化和瘢痕形成的作用,但是否能抑制视网膜色素上皮细胞(Retinal pigment epithelial, RPE)的增殖而用于眼后节疾病的治疗,目前尚未见文献报道。为此,我们采用冷冻复苏后的人

作者简介:李世洋(1964—),男,湖北省宜城市人,硕士,副主任医师,主要从事眼底病方面的研究,发表论文9篇。电话:(0537)3413106-32719
收稿日期:2002-02-21;修回日期:2002-06-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

RPE,加入羊膜匀浆培养,观察其对人 RPE 增殖的影响,探讨羊膜是否有用于治疗 PVR 的潜在可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 人 RPE 的来源与复苏

人 RPE 来自本科实验室冻存的第 4 代人 RPE。复苏时将含有 RPE 的冻存管从液氮中取出并立即置于 40~50 ℃水浴中,不断摇动,使其 1~2 min 内融化,迅速加入 3~5 倍含 10% FBS 的 D/F12 培养液,吹打混匀,垂悬细胞后培养传代。

### 1.2 羊膜匀浆的制备

1.2.1 羊膜的制备 参照陈家祺等[5]介绍的方法制备羊膜置实验室备用(1 h 内用)。

1.2.2 羊膜匀浆的制备 将羊膜在 PBS 液中清洗 3 次,约 10~15 min,取适当大小羊膜称湿重,按 1∶1 加 PBS 液放入匀浆机中,在冰浴条件 5 000 r/min,10 冲程磨制匀浆,每冲程 30 s。取出匀浆按 1∶5 加 PBS 液于离心管中离心,2 000 r/min,10 min,取上清液备用(1 h 内用)。

1.2.3 测定羊膜匀浆蛋白含量 采用 Folin-酚试剂法。

### 1.3 实验观察

1.3.1 人 RPE 抑制率观察(MTT 法) 取复苏传代的第 6 代人 RPE 用含 10% FBS 的 D/F12 培养液垂悬并以 2.5×$10^4$ 个/ml 密度接种于 96 孔板中,100 μl/孔,培养 24 h 后吸出培养液,以无血清 D/F12 培养液洗 3 遍,按分组(分组为:培养液中加入羊膜匀浆量分别为 0、5、10、20 μl,则培养液中羊膜匀浆蛋白含量为 0、40、80、160 μg/ml)加入羊膜组织匀浆及 10% FBS 的 D/F12 培养液,100 μl/孔,每组共设 9 孔并平行设空白调零(无细胞只加培养液),置 $CO_2$ 孵箱中培养 24、48、96 h 待测。检测时每孔加入 MTT 20 μl 继续培养 4 h,弃培养液,加入二甲基亚砜 150 μl,震荡 10 min,酶联免疫检测仪 490 nm 波长下读取吸光度($A$)值,并计算抑制率。细胞抑制率=(对照组 $A$ 值-实验组 $A$ 值)/对照组 $A$ 值×100%。

1.3.2 细胞活力检测 取复苏传代的第六代人 RPE 用含 10% FBS 的 D/F12 培养液垂悬并以 2.5×$10^4$/ml 密度接种于 24 孔板中,1 ml/孔,培养 24 h 后吸出培养液,以无血清 D/F12 培养液洗 3 遍,按分组加入羊膜组织匀浆及 10% FBS(分组为:培养液中加入羊膜匀浆量分别为 0、50、100、200 μl,则培养液中羊膜匀浆蛋白含量为 0、40、80、160 μg/ml),每组共设 9 孔,置 $CO_2$ 孵箱中培养 24、48 和 96 h 各任取 3 孔消化收集细胞,行台盼蓝染色活细胞计数,取平均值,同时检测细胞活力。细胞活力=活细胞数/(活细胞数+死细胞数)×100%以上实验同样条件下重复 2 次。

### 1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 羊膜匀浆制备

新鲜羊膜制成匀浆后,测蛋白含量为 815.3 μg/ml(近似 800 μg/ml)。

### 2.2 人 RPE 体外培养,免疫学鉴定

本次实验所用人 RPE 为本科实验室已作过组织学形态及免疫组织化学鉴定的冻存细胞。细胞冻存后复苏存活率达 80%,细胞形态及生长速率与冻存前相比无明显差异。本次复苏细胞为传代第 4 代细胞,实验用为第 6 代细胞。

### 2.3 羊膜匀浆对人 RPE 增殖作用的影响

2.3.1 不同浓度羊膜匀浆对人 RPE 增殖的抑制率(MTT 法) 结果见表 1。

表 1 不同浓度羊膜匀浆对人 RPE 增殖的抑制率(%,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The inhibition rate of HAM at different concentrations on proliferation of HRPE cells at different time points by tetrazotium (MTT) colorimetric assay(%,$\bar{x}\pm s$)

| Time (h) | Concentration of HAM (μg/ml) | | |
|---|---|---|---|
| | 40 | 80 | 160 |
| 24 | 50.774±2.291 | 27.387±4.091 * | 14.802±3.725 ** |
| 48 | 4.494±3.767 △△ | −0.944±8.631 △ | −3.693±3.651 △ |
| 96 | 8.388±5.567 △△ | −9.425±4.471 *△△ | −17.651±6.748 **△△ |

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* 40 μg/ml group at same hour;
△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* 24 h group at same concentration

由表 1 结果显示:① 在同一时相点,不同浓度羊膜匀浆对人 RPE 增殖的作用不同。在培养液中加入羊膜匀浆后 24 h,3 个浓度均出现对人 RPE 增殖的抑制作用,而且随羊膜匀浆浓度的增加抑制作用减弱,抑制率间 40 μg/ml(50.774%)与 80 μg/ml(27.387%)相差显著($P<0.05$),40 μg/ml 与 160 μg/ml(14.802%)相差非常显著($P<0.01$)。在 48 h,羊膜匀浆在低浓度(40 μg/ml)时,对人 RPE 增殖是抑制作用(4.494%),而在中(80 μg/ml)、高浓度(160 μg/ml)时为促增殖作用(抑制率分别为−0.944%、−3.693%),但抑制率间的差异无统计学意义($P>0.05$)。在 96 h,羊膜匀浆仅在低浓度时,对人 RPE 增殖起抑制作用,而在中、高浓度时对人 RPE 增殖起促进作用,抑制率间 40 μg/ml(8.388%)与 80 μg/ml(−9.425%)相差显著($P<0.05$),40 μg/ml 与 160 μg/ml(−17.651%)相差非常显著($P<0.01$)。② 在同一浓度,不同时相点羊膜匀浆对人 RPE 增殖的作用不同。在羊膜匀浆浓度为 40 μg/ml 时,各时相点羊膜匀浆对人 RPE 增殖均为抑制作用,在 24 h 与 48 h 间和 96 h 间的抑制率相差均非常显著($P<0.01$)。在羊膜匀浆浓度为 80、160 μg/ml 时,随着作用时间延长,羊膜匀浆对人 RPE 增殖的作用逐渐由抑制变为促进作用,抑制率间 24 h 与 48 h 相差显著($P<0.05$),24 h 与 96 h 相差非常显著($P<0.01$)。

2.3.2 羊膜匀浆对 RPE 细胞活力的影响 由表 2 可见,在 96 h 内,各羊膜匀浆浓度组及对照组人 RPE,随培养时间延长,细胞活力增加($P<0.05$);各时相点细胞活力与羊膜匀浆浓度无显著性差异($P>0.05$)。

表 2 不同时间不同羊膜匀浆浓度下的细胞活力($\bar{x}\pm s$,%)

Tab 2 The viability of HRPE cells at different concentrations of HAM groups and at different time points($\bar{x}\pm s$,%)

| Time (h) | Concentration of HAM (μg/ml) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 40 | 80 | 160 |
| 24 | 76.05±9.14 | 74.69±8.09 | 72.03±3.95 | 77.29±9.16 |
| 48 | 83.92±6.44 * | 85.04±2.91 * | 85.49±4.59 * | 91.56±6.72 * |
| 96 | 97.19±3.59 ** | 95.82±3.28 *▲△ | 96.03±3.09 **△△ | 94.57±2.93 |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 24 h group at same concentration;
△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* 48 h group at same concentration

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 3　讨论

增殖性玻璃体视网膜病变(Proliferative vitreoretinopathy, PVR)是孔源性视网膜脱离手术失败的主要原因[1]。目前对PVR的治疗主要实行玻璃体切割手术,但手术并发症多,同时手术又是PVR的一个重要诱因。即使手术成功也可因PVR的存在而影响其视功能。因而许多学者一直在努力寻求抑制细胞增生的药物进行辅助治疗。目前围绕PVR中主要的增殖细胞-RPE的各种生物学活动的药物调控研究以及细胞因子、基因治疗研究成为热点[1~4]。但因药物对视网膜毒性大,迄今为止还没有一种药物在临床上获得应用[3]。

自1995年Kim等[6]报道用经过处理和保存的羊膜重建眼表获得成功以来,羊膜已成为重建眼表的理想生物材料。近来临床及实验研究[5~11]显示,羊膜的主要作用表现在:①延长上皮细胞的生命、维持其克隆形象;②刺激上皮细胞的分化;③在置于含有成纤维细胞的结膜时能刺激杯状细胞的分化;④通过蛋白酶的活性,清除炎症细胞;⑤抑制TGF-β的信号传递和抑制正常成纤维细胞分化为肌成纤维细胞。通过上述五方面达到加速上皮化、维持正常上皮表型、减轻炎症反应、减轻血管化和减少瘢痕形成等临床治疗效果。

受到羊膜在眼表重建中表现出的抑制成纤维细胞增生、减少血管化和瘢痕形成的启发,我们对羊膜是否有抑制RPE增殖作了初步实验研究,结果显示:羊膜匀浆对人RPE增殖的作用与羊膜匀浆的浓度及作用时间有关,即羊膜匀浆在低浓度短时间内对人RPE有抑制作用,随着浓度增加,作用时间延长,则逐渐由抑制作用变为促进增殖作用。由于本研究为初步观察,故羊膜匀浆这种与时间、浓度相关的双相调节作用的确切机制尚不清楚。结合近来研究成果,我们推测其可能机制为:羊膜匀浆的生物学效应来源于匀浆中的细胞因子,尽管目前报道在羊膜匀浆中检测到的细胞因子仅有TGF-β1、β2、bFGF、HGF[9],我们相信还有许多未知的细胞因子存在。也就是说,本研究中羊膜匀浆表现出的对人RPE的生物学效应是由众多细胞因子作用的总结果。研究已表明[2,4],细胞因子具有低浓度,高活性,有一定的细胞特异性,即不同的细胞因子作用于同一细胞,会产生不同的生物学效应,而同一细胞因子作用于不同的靶细胞也会有不同的效应。此外一些细胞因子还表现出作用的时向性和浓度的双向性。例如bFGF、HGF、PDGF等促进RPE的增殖,而TGF-β则抑制上述这些生长因子对RPE增殖的作用。同时TGF-β在PVR发生发展中的作用表现为双向性,其作用的效果与其所作用的细胞类型,细胞的分化状态,环境中存在的其它生长因子有关[2,4]。因此我们认为羊膜匀浆对人RPE的双向性作用是由于羊膜匀浆中的细胞因子在实验过程中,随着作用时间的延长,各种细胞因子的含量、活性以及细胞因子间的比例发生改变,而不同浓度羊膜匀浆对RPE的生物学作用也因各种因子的浓度、因子间的比例的变化而不同,而表现出不同的生物学作用效果。

此外本研究还观察了羊膜匀浆对人RPE活力的影响,结果显示,各不同浓度的羊膜匀浆间及与对照组间细胞活力无明显差异。表明羊膜匀浆对人RPE无毒性作用,也未随浓度的增加而出现毒性作用。

综上所述,通过将羊膜匀浆加入人RPE的培养液中初步观察其对人RPE增殖的影响。表明羊膜匀浆在低浓度、短时间内对人RPE增殖有抑制作用;随着浓度增加、作用时间延长,抑制作用减弱,并逐渐变为促进增殖作用,因而,羊膜匀浆用于临床治疗PVR的可能性不大。通过细胞活力检测,未发现羊膜匀浆对人RPE产生毒性作用。其确切机制及应用前景有待进一步研究。

参考文献:


[1] Charteris D G. Proliferative vitreoretinopathy: Pathobiology, surgical management, and adjunctive treatment[J]. Br J Ophthalmol, 1995, 79(10): 953－960.

[2] 丁小燕. 生长因子和细胞外基质在PVR中的作用[J]. 国外医学眼科学分册, 1999, 23(5): 286－291.

[3] Kon C H, Occleston N L, Aylward G W, *et al*. Expression of vitreous cytokines in proliferative vitreoretinopathy: a prospective study[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(3): 705－712.

[4] Charteris D G. Growth factors in proliferative vitreoretinopathy Br[J]. J Ophthalmol, 1998, 82(2): 106.

[5] 陈家祺, 周世有, 黄　挺, 等. 新鲜羊膜移植治疗严重的急性炎症期及瘢痕期眼表疾病的临床研究[J]. 中华眼科杂志, 2000, 36(1): 13－17.

[6] Kim J C, Tseng S C G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas[J]. Cornea, 1995, 14(5): 473－484.

[7] Panda A. Amniotic membrane transplantation in ophthalmology(fresh v preserved tissue)[J]. Br J Ophthalmol, 1999, 83(12): 1410－1411.

[8] Dua H S, Azuara Blanco A. Amniotic membrane transplantation[J]. Br J Ophthal Mol, 1999, 83(6): 748－752.

[9] Sato H, Shimazaki J Shi, Ozaki N, *et al*. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplaniahcn[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(4): S428.

[10] Tseng S C, Li D Q, Ma X, *et al*. Down-reculation of TGF-β1, β2, β3, and TGF-β receptor Ⅱ expression in human corneal fibroblasts by amniotic membrane[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(4): S428.

[11] Lee S B, Li D Q, Tan D T, *et al*. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane[J]. Curr Eve Res, 2000, 20(4): 325－334.


(编辑　郭建秀)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net