

· 实验研究 ·

苏拉明对体外培养的人眼视网膜色素上皮细胞增生抑制作用的时效性研究

唐仕波 朱晓波 罗燕 林少芬 黄祥坤

【摘要】 目的 观察苏拉明对体外培养的人眼视网膜色素上皮(RPE)细胞增生抑制作用的时效关系,了解它对 RPE 细胞的作用方式,进一步阐明其防治增生性玻璃体视网膜病变(PVR)的优势。方法 9 块 96 孔细胞培养板,每块取 12 孔,其中实验组和对照组各 6 孔。2 组各孔内均接种浓度为 5×10^4 个/ml 的 RPE 细胞 0.1 ml。换液后实验组加 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 苏拉明,对照组不加。4 d 后 2 组均更换成正常培养液;在生物倒置显微镜下观察 RPE 细胞生长情况;分别于加药后 1、2、4 d 及撤药后 1、2、3、5、7、9 d 随机抽取 1 块培养板终止培养,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测同一培养板上两组 RPE 细胞增生情况。随机化区组 *t* 检验比较两组吸光度值的差异,计算细胞增生抑制率。结果 倒置显微镜下,对照组 RPE 细胞在接种后第 7 天完全融合。实验组细胞间隙较对照组稍增大,接种 13 d 时细胞仍未融合。实验组 RPE 细胞加入苏拉明后第 1 天,增生抑制率为 14.85%,第 4 天达最高 25.79%;撤药后第 1 天下降到 12.35%,然后逐渐又上升,到撤药后第 3~5 天达顶峰超过 20%,之后逐渐回落,到第 9 天达 14.71%。结论 苏拉明对血清诱导的 RPE 细胞增生具有长时间的抑制作用,特别是在撤除药物后还能再次引起后抑制作用,整个过程呈现特殊的双峰型抑制效应。

【关键词】 玻璃体视网膜病; 增生性/药物疗法; 苏拉明/治疗应用

中图分类号:R774.1 R969

Long-term effect of suramin on the inhibition of proliferation of cultured human retinal pigment epithelial cells TANG Shi-bo, ZHU Xiao-bo, LUO Yan, et al. Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: TANG Shi-bo, Email: sbtang@gzsums.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the long-term effect of suramin on the inhibition of proliferation of human retinal pigment epithelial (RPE) cells in vitro. Methods RPE cells grown in 9 pieces of 96-well plate (12 wells each plate) were divided into experimental and control group, with 6 wells in each group. The concentration of 0.1 ml RPE cells in each well is 5×10^4 cells/ml. After the change of the medium, RPE cells were treated with suramin (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in experimental group while treated with nothing in the control group. The medium of the 2 groups were changed to the normal medium after 4 days. At the 1st, 2nd, and 4th day after the addition of suramin and at the 1st, 2nd, 3rd, 5th, 6th, 7th, 9th, 11th and 13th day after removing suramin, 1 plate was randomly selected to stop culturing, and the proliferation of RPE cells were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Results Under reversed microscope, RPE cells in control group were fused completely at the 7th day after inoculation. The extracellular space of RPE cells in experimental groups was larger than that in the control group, and remained unfused at the 13th day after inoculation. The inhibitory rate of proliferation of RPE cells at the first day after treated with suramin was 14.85% and increased to the highest 25.79% at the 4th day. The first day after the suramin-containing media was removed, the inhibitory rate decreased to 12.35%, and then raised gradually to over 20% at the 3rd to 5th day. Finally, the rate drop to 14.71%. Conclusion Suramin has the long-term effect on the inhibition of RPE cells induced by serum, especially the inhibitive effect after the remove of suramin, which indicates the specific double-peak inhibition during the whole process.

【Key words】 Vitreoretinopathy; Proliferative/drug therapy; Suramin/therapeutic use

增生性玻璃体视网膜病变(PVR)是一种常见致盲性眼病。虽然近 30 年来玻璃体视网膜显微手术的进

步使手术成功率显著提高,但仍不可避免存在一定数量的复发和失败。随着对 PVR 发病机制认识的不断深入,寻求手术之外的药物辅助疗法仍然是 PVR 防治的热点。PVR 的病理特征是细胞增生,视网膜色素

基金项目:广东省重点科技攻关项目(97-45)
作者单位:510060 广州,中山大学中山眼科中心
通讯作者:唐仕波,Email:sbtang@gzsums.edu.cn

上皮(RPE)细胞是主要的增生细胞之一。以往的研究都从量效关系角度报道苏拉明对 RPE 细胞的抑制作用^[1,2],我们通过观察苏拉明对 RPE 细胞抑制作用的时效关系,进一步阐明它防治 PVR 的优势。

1 材料和方法

1.1 实验试剂与仪器

苏拉明(美国 Sigma 公司),噻唑蓝(美国 Sigma 公司)。960 型全自动酶标仪(美国 Sigma 公司),多通道连续可调微量加样器(德国 Wheaton 公司)。

1.2 实验步骤

采用胰蛋白酶消化法^[3]体外培养的第 6 代人眼 RPE 细胞,以 5×10^4 个/ml 的浓度接种于 9 块 96 孔细胞培养板,每块培养板以 0.1 ml 每孔接种 12 孔,分为实验组和对照组,每组各 6 孔。接种 24 h 后更换培养液,实验组给予含 250 $\mu\text{g/ml}$ 苏拉明的 10% 胎牛血清 Delbecco 改良 Eagle 培养液(DMEM),对照组给予 10% 胎牛血清 DMEM(不含苏拉明),2 d 后两组再次更换各自同样的培养液。用药 4 d 后,两组均更换成正常的 10% 胎牛血清 DMEM,以后每 2 天换液一次。

在生物倒置显微镜下观察细胞生长情况。分别于加药后 1、2、4 d 及撤药后 1、2、3、5、7、9 d 随机抽取 1 块培养板终止培养,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测同一培养板上两组 RPE 细胞增生情况。于培养终止前 4 h,两组各孔分别吸出培养液 0.05 ml,再加入 5 mg/ml 的 MTT/DMEM 液 10 μl ,孵育 4 h 后,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)50 μl ,并在微量振荡器上振荡 10 min,以充分溶解去甲磺结晶。调零孔也同样加入 50 μl DMSO。酶联免疫检测仪测定各孔吸光度 A [旧称光密度(OD)]值,检测波长为 490 nm。

1.3 统计学分析

采用随机化区组 *t* 检验比较每天实验组与对照组 A 值的差异,计算细胞增生抑制率。细胞增生抑制率 = $(1 - \text{实验组细胞 A 值} \div \text{对照组 A 值}) \times 100\%$

2 结果

2.1 细胞生长情况

倒置显微镜下,两组 RPE 细胞均由孔底周边或一侧逐渐向四周围移行扩散,实验组细胞在暴露药物过程中及以后,形态与对照组无明显差异,未见细胞变圆、回缩、漂浮及死亡,细胞间隙较对照组稍增大。对照组 RPE 细胞在接种后第 7 天完全融合,实验组细胞在撤药后 9 d 仍未融合。

2.2 细胞增生情况

各时间点实验组 RPE 细胞的 A 值均数均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 1)。实验组 RPE 细胞加入苏拉明后第 1 天的增生抑制率为 14.85%,第 4 天达最高 25.79%,撤药后第 1 天下降到 12.35%,然后逐渐又上升,到撤药后第 3~5 天达顶峰超过 20%,之后逐渐回落,到第 9 天达 14.71%(表 1)。

表 1 加药和撤药后不同时间两组 RPE 细胞增生情况

| 时间(d) | RPE 细胞 A 值($\bar{x} \pm s$) | | 实验组增生抑制率(%) | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|-------|-------------------------------|---------------|-------------|------------|------------|
| | 实验组 | 对照组 | | | |
| 加药后 | | | | | |
| 1 | 0.237 ± 0.007 | 0.279 ± 0.005 | 14.85 | 11.96 | <0.001 |
| 2 | 0.272 ± 0.018 | 0.337 ± 0.008 | 19.50 | 8.08 | <0.001 |
| 4 | 0.187 ± 0.008 | 0.252 ± 0.018 | 25.79 | 8.08 | <0.001 |
| 撤药后 | | | | | |
| 1 | 0.257 ± 0.009 | 0.293 ± 0.011 | 12.35 | 6.20 | <0.001 |
| 2 | 0.270 ± 0.005 | 0.319 ± 0.006 | 15.38 | 16.97 | <0.001 |
| 3 | 0.287 ± 0.032 | 0.359 ± 0.012 | 20.07 | 5.16 | <0.001 |
| 5 | 0.305 ± 0.010 | 0.387 ± 0.007 | 21.18 | 16.15 | <0.001 |
| 7 | 0.329 ± 0.009 | 0.398 ± 0.028 | 17.34 | 5.75 | <0.001 |
| 9 | 0.348 ± 0.007 | 0.408 ± 0.033 | 14.71 | 4.36 | <0.01 |

3 讨论

苏拉明学名聚磺砷萘基脲(polysulfonated naphthylurea),其化学结构和药理学特性与肝素类似,与肝素结合蛋白相结合。虽然其作用机制尚未完全清楚,但近年来研究发现它具有一系列特殊的生物学活性,可以特异性竞争抑制包括血小板源性生长因子(PDGF-A,B)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等一系列生长因子与各自受体结合的能力^[4],从而起到抑制各种类型细胞增生的作用。还有报道苏拉明诱导背根节神经元凋亡^[5]。它作为一种杀锥虫药于 1917 年合成并用于临床,最近有用其治疗艾滋病和顽固性肿瘤的临床及实验研究报道^[6]。de Souza 等^[7]采用静脉点滴,发现苏拉明可以明显降低兔眼模型 PVR 的视网膜脱离的发生率和严重程度。

本实验结果显示,在整个实验过程中,实验组细胞 A 值的均数始终明显低于对照组,反映出在长达约 2 周的时间内实验组都一直处于被抑制状态。在药物作用的前 4 d 内,细胞抑制逐步明显,增生抑制率逐渐增大,说明苏拉明对 RPE 细胞的药理作用是逐步发挥出来的,而非短时的冲击性作用。

本实验结果还提示,苏拉明对血清诱导 RPE 细胞增生的抑制具有特殊的撤药后反弹现象。撤药后第 1 天,细胞的增生抑制率明显下降,从用药第 4 天时的 25.79% 急剧降至 12.35%,但是,从撤药后第 2 天直

到第 5 天,细胞增生抑制率又明显回升,而且大大超过了撤药后第 1 天,到撤药后第 3~5 天达顶峰之后再次回落,整个过程呈现特殊的双峰型抑制效应。文献报道苏拉明 6 个硫砷基团在生理性 pH 状态下完全处于离子化,它与细胞外生长因子受体的结合处在动态的平衡之中,由于它所带的电荷致使其不能自由出入细胞膜,它主要通过细胞摄粒作用或胞饮作用通过细胞膜,因此具有时间上的阻延性^[8]。本研究中撤药第 1 天,细胞内的苏拉明还来不及通过细胞膜到细胞外,而培养液中血清所含有的新鲜细胞因子与其受体结合就自然促进了细胞的明显增生。但随着时间的推移,苏拉明逐渐移出到细胞外,与细胞外的生长因子竞争,再次发挥其抑制作用,因此细胞的增生抑制率逐渐上升。文献报道的苏拉明蛋白结合率很高,达 98% 以上^[9],其眼内清除时间相对其他药物更是明显延长超过 10 d^[10],因此必然在细胞内维持一段较长的时间,撤药后其残留的药效必然对细胞造成长时间的影响。撤药后第 3 至 5 天,增生抑制率再次达到高峰,然后才逐步减低,至撤药后第 9 天时仍为 14.71%。照此推算,估计苏拉明对 RPE 细胞的增生抑制会持续至撤药后 2 周。国外学者报道撤药后第 8 天细胞才恢复正常的增生能力^[1]。

综上所述,我们的研究结果提示,苏拉明对 RPE 细胞的增生抑制作用具有明显的长效影响,即使在药

物撤除后仍可再次发挥较长时间的后反弹抑制效应。苏拉明这个特点使其在抗 PVR 药物中具有明显的时效优势,有望成为抗 PVR 药物的新选择。

4 参考文献

- 1 Stec L, Hartzler M, Hassan TS, et al. Effects of suramin on cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35: 1768.
- 2 康军,惠延年,崔志利等. 苏拉明对体外培养视网膜色素上皮细胞增殖的影响. *第四军医大学学报*, 2002, 23: 641-643.
- 3 郑健梁,金学民,郑湖玲等. 人视网膜色素上皮细胞的培养及鉴定. *中国实用眼科杂志*, 1999, 17: 407-409.
- 4 Hu Y, Zou Y, Dietrich H, et al. Inhibition of neointima hyperplasia of mouse vein grafts by locally applied suramin. *Circulation*, 1999, 100: 861-868.
- 5 Gill JS, Windebank AJ. Suramin induced ceramide accumulation leads to apoptotic cell death in dorsal root ganglion neurons. *Cell Death Differ*, 1998, 5: 876-883.
- 6 Garcia-Schurmann JM, Schulze H, Haupt G, et al. Suramin treatment in hormone- and chemotherapy-refractory prostate cancer. *Urology*, 1999, 53: 535-541.
- 7 de Souza OF, Sakamoto T, Kimura H, et al. Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy in rabbits by suramin. *Ophthalmologica*, 1995, 209: 212-216.
- 8 Stein CA. Suramin: A novel antineoplastic agent with multiple potential mechanisms of action. *Cancer Res*, 1993, 53: 2239-2248.
- 9 Tjaden UR, Reeuwijk HJ, van der Greef J, et al. Bioanalysis of suramin in human plasma by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1990, 525: 141-149.
- 10 Hassan TS, Hartzler MK, Cheng M, et al. Anti-angiogenic effects, ocular toxicity and vitreous clearance of suramin in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35: 1374.

(收稿日期:2003-10-24)

(本文编辑:朱敏)

中华眼底病杂志第五届编辑委员会成员名单

顾 问 张承芬 廖菊生

总 编 辑 严 密

副总编辑 张军军 黎晓新 惠延年 王文吉 曹安民

编辑委员 (按汉语拼音字母排序)

陈 松 陈有信 戴 虹 董方田 顾欣祖 郭希让 胡玉章 黄 倩 惠延年 姜德咏
姜燕荣 雷嘉启 黎晓新 刘哲丽 陆 方 吕 林 罗清礼 马景学 马志中 彭晓燕
孙宪丽 唐仕波 王 竞 王景昭 王文吉 王雨生 韦纯义 魏文斌 文 峰 吴德正
吴雅臻 邢怡桥 许 迅 徐格致 严 密 杨培增 阴正勤 张军军 张卯年 赵堪兴
赵明威

海外编委 Myron Yanoff Alexander Brucker Stanley Chang David Wong Bernd Kirchhof

Yasuo Tano Oh Woong Kwon 曹安民 何志平 林顺潮 刘荣宏 林嘉理 许福全