

酮咯酸氨丁三醇对兔角膜细胞及纤连蛋白的影响

晏丕松 杜之渝 牟章兵

【摘要】 目的 探讨酮咯酸氨丁三醇 (Ketorolac tromethamine 0.5%, Acular, 安贺拉) 对培养兔角膜细胞及细胞外基质纤连蛋白(Fibronectin, FN)的影响。方法 选用原代及传代兔角膜细胞, 实验组加入含不同浓度酮咯酸氨丁三醇的培养液, 对照组加入等量空白培养液, 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测其对细胞增殖的抑制, 倒置相差显微镜观察其对细胞的形态学改变, 并进一步采用免疫细胞化学和 ELISA 研究其对角膜细胞分泌 FN 的影响。结果 酮咯酸氨丁三醇浓度为 50-175 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 作用 24、48、72 h 均抑制角膜细胞的增殖 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性。免疫细胞化学显示对照组可见胞浆着色及胞间丝状着色, 而加药组仅见胞浆少量着色。ELISA 结果显示低浓度时 FN 含量增加, 而高浓度时其含量明显减少。结论 酮咯酸氨丁三醇对角膜细胞的增殖有抑制效应, 呈剂量依赖性, 并且高浓度时可明显减少 FN 的含量。酮咯酸氨丁三醇可能通过抑制角膜细胞的增殖和减少细胞外基质, 从而防止屈光术后的屈光回退。

【关键词】 酮咯酸氨丁三醇; 角膜细胞; 纤连蛋白

Ketorolac tromethamine for the effect of keratocytes and the fibronectin YAN Pi-song, DU Zhi-yu, MU Zhang-bing. Ophthalmic Center, the Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China

【Abstract】 **Objective** To study ketorolac tromethamine for the effect of rabbit keratocytes and the fibronectin. **Methods** The primary culture and subculture of were exposed to different concentrations of ketorolac tromethamine in experimental group and to culture media in contrast group. The inhibitive characteristics of ketorolac tromethamine to the cells' proliferation were measured with methyl thiazolyl thiazolium (MTT) assay. The morphology of cells were observed with light microscope. The changes of the fibronectin were measured by immunocytochemistry. And an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the content of the fibronectin in supernate. **Results** After the treatment of 50-175 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ketorolac tromethamine, rabbit keratocytes showed the marked inhibition whenever in 24h, 48h or 72h ($P < 0.05$) and showed dosage dependence. Immunocytochemistry showed the positive staining of fibronectin was stronger in cell covers of control group than that of experimental group. ELISA method demonstrated increase in supernate FN content of low concentration while decrease it of high concentration. **Conclusion** Ketorolac tromethamine has obvious inhibitive effect on rabbit keratocytes and showed dosage-effect relation. The supernate FN content was decreased obviously in high concentration group. Ketorolac tromethamine likely lightens the regression of refractive surgery by means of antiproliferative effect and reducing the extracellular matrix.

【Key words】 Ketorolac tromethamine; Keratocytes; Fibronectin

准分子激光角膜屈光手术已日益成熟、疗效确切, 但无论是 PRK、LASIK、LASEK 还是 Epi-LASIK 都存在屈光回退这一并发症。近来研究表

明, 其发生机制都与角膜组织创伤愈合反应有关, 其中角膜细胞的活化增生以及分泌的大量细胞外基质在角膜创伤愈合反应中扮演着重要的角色^[1,2]。因此, 如何抑制屈光术后角膜组织创伤的过度愈合, 防止其愈合性瘢痕形成, 是角膜屈光手术研究中的重要课题。目前, 临床主要用激素类眼液来防止屈光回退, 但长期大量应用会导致激素性青光眼。我

基金项目: 本课题为重庆市卫生局科技计划项目资助项目 (04-2-072)

作者单位: 400010 重庆, 重庆医科大学附属第二医院眼科中心
通讯作者: 杜之渝, E-mail: cqkryk@hotmail.com

们在临床应用中发现酮咯酸氨丁三醇 (Ketorolac tromethamine 0.5%, Acular, 安贺拉) 也具有减轻屈光回退的作用。因此, 本文旨在探讨酮咯酸氨丁三醇对培养兔角膜细胞及细胞外基质纤连蛋白 (Fibronectin, FN) 的影响, 对指导其临床应用具有重要意义。

材料与方 法

一、试剂及仪器

培养基为 DMEM+F12 (Hyclone 美国), 加入 100ml/L 胎牛血清 (杭州四季青生物工程公司), 青霉素 (100×10^3 U/L) 与链霉素 (100×10^3 U/L), 以及 10mol/L 的 HEPES (HEPES buffer), PH 值为 7.2-7.4。MTT (上海华舜生物工程有限公司), 纤连蛋白 (Fibronectin, FN) I 抗 (北京中山生物技术开发公司), ELISA 试剂盒 (Technoclone 美国), 酮咯酸氨丁三醇眼液 (眼力健 美国), 倒置相差显微镜 (Nikon, 日本)。

二、方法

1. 角膜细胞的分离及原代培养: 无菌条件下摘取兔眼球, 自角膜缘内侧 1mm 剪下角膜全层组织片。PBS 液冲洗 2 遍, 解剖显微镜下撕掉上皮层、前基质层、后弹力层及内皮层。将剩下的基质层剪碎成 1mm 大小的组织片, 接种于 50ml 培养瓶中进行原代培养并传代。

2. MTT 法检测酮咯酸氨丁三醇对兔角膜细胞增殖的影响 设正常对照组和酮咯酸氨丁三醇 (6 个浓度) 作用 24h、48h 及 72h 的实验组, 每组 5 个复孔。取原代及传代对数生长期角膜细胞, 以 4×10^3 个/ml 的细胞浓度, 接种于 96 孔培养板, 200 μ L/孔。培养 24h, 细胞绝大部分贴壁后, 弃掉培养液, 实验组每孔加入 180 μ L 新鲜培养液, 再加入 20 μ L 酮咯酸氨丁三醇药液使其终浓度分别为 50、75、100、125、150、175 μ g/ml, 对照组加入 20 μ L 空白培养液。分别培养 24h、48h 及 72h 后, 用 MTT 法测定吸光度 (A) 值, 并计算出酮咯酸氨丁三醇对角膜细胞的抑制率。抑制率 = $1 - \text{存活率}$, 存活率 = $(\text{实验组平均吸光度值} / \text{正常对照组平均吸光度值}) \times 100\%$ 。用回归方程求出酮咯酸氨丁三醇的中效浓度 (IC₅₀)^[3]。

3. 细胞的形态学观察: 将浓度为 4×10^3 个/ml 的角膜细胞悬液接种于培养瓶中, 实验组加四分之三中效浓度 (IC₅₀) 的酮咯酸氨丁三醇 (依据 MTT48h 结果) 使其终浓度为 125 μ g/ml, 对照组加入等量空白培养液, 继续培养 48h 后, 直接在倒置相差显微镜观察及采图。

4. 细胞铺片的制备及免疫细胞化学 SABC 法: 将浓度为 4×10^3 个/ml 的角膜细胞悬液接种于 24 孔培养板中, 每孔 1ml, 孔内已预置盖玻片, 待细胞生长 24h 后, 实验组加入酮咯酸氨丁三醇药液使其终浓度为 125 μ g/ml, 培养 48h 后取出盖玻片, 95% 冷乙醇固定备用。用免疫细胞化学 SABC 法检测胞浆及胞间 FN 的表达情况。

5. 培养液上清液检测 FN 表达 (ELISA 法): 设正常对照组和酮咯酸氨丁三醇 (4 个浓度) 作用 48h 的实验组, 细胞接种情况同方法 2。实验组每孔加入 180 μ L 新鲜培养液, 再加入 20 μ L 酮咯酸氨丁三醇药液使其终浓度分别为 50、100、150、200 μ g/ml, 对照组加入 20 μ L 空白培养液。继续培养 48h 后分别收集培养上清液, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。采用纤连蛋白含量酶免法试剂盒 (Technoclone 美国) 操作, 酶标仪 (Bioelisa reader ELx800) 490nm 处, 以空白对照孔调零, 测定各孔吸光值 (A), 以 A₄₉₀ 对 FN 标准品浓度 (μ g/ml) 在半对数坐标纸上作标准曲线, 根据标本的 A 求出 FN 含量 (μ g/ml)。

三、统计方法

采用统计软件包 SAS8.0 版统计软件对计量资料进行单因素方差分析, 用 Least-significant-difference (LSD) 法进行两两比较。回归方程的建立采用直线回归法。

结 果

一、对角膜细胞增殖的影响

MTT 比色法检测酮咯酸氨丁三醇对角膜细胞的抑制作用, 结果见表 1。显示酮咯酸氨丁三醇对角膜细胞生长有抑制效应。在作用 24h、48h 和 72h 的时间段, 随着浓度的增加, 吸光度值 (A 值) 呈现较明显的下降趋势, 并显示明显的剂量-效应依赖关系。药物浓度与 A 值具有良好的相关性, 且以 48h 最佳。利用回归方程求出酮咯酸氨丁三醇作用 48h 后角膜细胞被抑制 50% 的中效浓度为 170.50 μ g/ml。

二、形态学变化

倒置相差显微镜观察: 对照组细胞贴壁良好, 长梭形, 呈明显的漩涡状生长, 细胞呈融合状态, 其间隙不明显 (见图 1)。加药组可见部分细胞变圆脱落, 细胞间隙明显增大, 贴壁欠佳 (见图 2)。

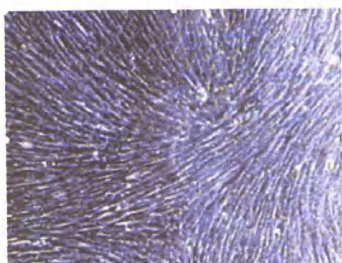
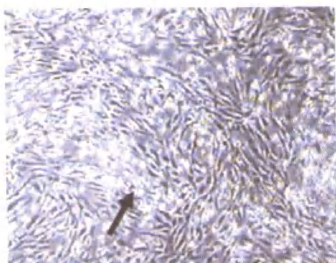
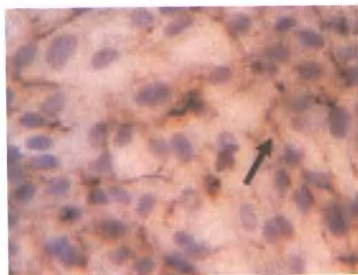
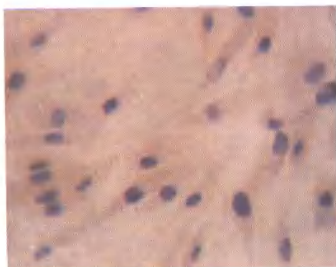
三、免疫细胞化学 SABC 法染色结果

FN 定位于胞浆及胞间, 对照组可见胞浆着色及胞间丝状着色, 而加药组仅见胞浆少量着色 (见图 3、4)。

表1 不同浓度对角膜基质细胞生长的抑制作用比较

药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	24h		48h		48h	
	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)
Acular175	0.0660 ± 0.0091	48.36*	0.1013 ± 0.0071	55.67*	0.1265 ± 0.0093	49.96*
Acular150	0.0730 ± 0.0080	42.88*	0.1348 ± 0.0109	41.01*	0.1513 ± 0.0107	40.15*
Acular125	0.0905 ± 0.0064	29.19*	0.1435 ± 0.0127	37.20*	0.1783 ± 0.0111	29.47*
Acular100	0.0968 ± 0.0036	24.26*	0.1553 ± 0.0123	32.04*	0.1835 ± 0.0227	27.41*
Acular75	0.0993 ± 0.0052	22.30*	0.1713 ± 0.0046	25.03*	0.1920 ± 0.0231	24.05*
Acular50	0.1058 ± 0.0062	17.21**	0.1928 ± 0.0067	15.62*	0.2098 ± 0.0083	17.01*
Control	0.1278 ± 0.0038		0.2285 ± 0.0059		0.2528 ± 0.0401	
F 值	35.70		93.21		14.98	
P 值	<0.0001		<0.0001		<0.0001	
R 值	-0.9792(<0.0001)		-0.9884(<0.0001)		-0.9710(<0.0003)	

备注: 与对照组比较, *:p<0.0001 **:p<0.001 ***:p<0.05

图1 对照组细胞贴壁良好 $\times 40$ 图2 加药组细胞间隙明显增大, 部分细胞变圆脱落 $\times 40$ (箭头所示)图3 对照组胞浆着色及胞间丝状着色 $\times 200$ (箭头所示)图4 加药组仅见胞浆着色 $\times 200$

四、ELISA 法检测培养液上清液中 FN 的含量
ELISA 法检测各组培养液上清液中 FN 的含量见表 2。酮咯酸氨丁三醇在 $50\mu\text{g/ml}$ 时 FN 的含量增加, 然而随着浓度的增加 FN 的含量明显减少。

表2 安贺拉作用后培养上清液中纤维连接蛋白的含量

药物浓度($\mu\text{g/ml}$)	FN 的含量	t 值	p 值
Control	0.3441 ± 0.0176		
Acular50	0.4203 ± 0.0100	5.95	<0.0001
Acular100	0.3400 ± 0.0303	-0.33	0.7490
Acular150	0.2542 ± 0.0060	-7.02	<0.0001
Acular200	0.2455 ± 0.0165	-7.71	<0.0001

备注: 标准曲线方程: $\text{Linear}(Y=0.4937(\log X)+1.0550)$ $R^2=0.9679$

讨 论

准分子激光角膜屈光手术已日益成熟、效果确切、应用广泛, 但屈光回退(Regression) 仍然是困扰广大眼屈光医师和患者的主要并发症之一。有文献报道, 其发生机制与角膜组织创伤愈合反应有关^[1,2]。角膜细胞的活化增生以及其分泌的大量细胞外基质在角膜创伤愈合反应中扮演着重要的角色。因此, 通过抑制角膜细胞活化增生和减少细胞外基质分泌, 有望阻止屈光术后的屈光回退。

酮咯酸氨丁三醇属于非甾体抗炎药(NSAID), 主要通过抑制花生四烯酸途径的环氧合酶(COX) 而减少前列腺素(PG) 的含量, 从而达到解热镇痛及抗炎的目的。许多研究发现PG可促进细胞增殖^[4], 而非甾体抗炎药(NSAID) 可能通过减少PG的合成, 发挥其抗增殖作用。另外, Nguyen^[5]等研究也发现酮咯酸氨丁三醇能够抑制小梁纤维母细胞的活化增生。脱离了正常生存环境, 体外培养的角膜细胞具有增殖、移行、分化和分泌的功能, 有别于静止状态的角膜细胞。而与在体激活的角膜细胞极其相似, 所以已被作为特殊的创伤模型来研究创伤愈

合问题^[6]。本研究通过体外实验证实, 酮咯酸氨丁三醇能够抑制角膜细胞的生长, 各实验组与对照组比较差异有显著意义, 并显示出明显的剂量-效应依赖关系。本研究同时也提示: 即便是最大浓度 175 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48h 后其抑制率也只有 55% 左右, 说明酮咯酸氨丁三醇可能对角膜细胞增殖的抑制作用不是很强。

同时, 本研究对酮咯酸氨丁三醇作用后的角膜细胞进行形态学观察, 显示其可使部分细胞变圆脱落, 细胞间隙明显增大, 贴壁欠佳, 与正常对照组比较差异较明显。作者推测这可能与酮咯酸氨丁三醇抑制角膜细胞分泌细胞外基质有关。角膜细胞分泌的细胞外基质主要有胶原、纤连蛋白 (FN)、层粘连蛋白等。其中 FN 是一种糖蛋白, 与细胞的增殖、分化和移行有密切关系, 并参与创面愈合过程。在术后早期, 创面的 FN 对上皮修复有积极的促进作用; 但另一方面, 在上皮修复以后, FN 与 III 型胶原等相互作用, 对创面新生组织的合成也有一定的促进作用。这些新合成的组织将“填平”已被切削掉的组织, 造成屈光回退^[7]。因此本研究进一步采用免疫细胞化学和 ELISA 对角膜细胞分泌的 FN 进行了定性和定量研究。其中免疫细胞化学结果显示, 对照组可见胞浆着色及胞间丝状着色, 而加药组仅见胞浆少量着色, 由此可见, 酮咯酸氨丁三醇对减少细胞外基质可能有较强的作用。同时 ELISA 结果显示, 酮咯酸氨丁三醇在 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时可使培养液上清液中 FN 的含量增加, 与对照组比较差异有非常显著意义, 然而随着浓度的增加又可使 FN 的含量明显减少, 与对照组比较差异亦有非常显著意义。因此, 作者认为酮咯酸氨丁三醇在低浓度时可能有助于促进角膜创伤愈合, 而在高浓度时对角膜创伤的过度愈合有一定程度的抑制作用。国外有文献报道, 将酮咯酸氨丁三醇用于治疗 LASIK 术后的过矫, 但其结果不甚理想^[8]。作者推测, 可能是临床使用的药物浓度 (0.5%) 较大, 主要表现为抑制角膜创伤的过度愈合, 从而起到防止屈光回退作用。

另外, 有文献报道, 酮咯酸氨丁三醇还可能通过抑制屈光术后炎症反应来减轻角膜创伤愈合反应^[9]。皮质类固醇是传统的抗炎及抗增殖药物。有人认为皮质类固醇激素强大的抗炎作用使得屈光手术损伤

的角膜组织中多种炎性介质, 如 IL、TNF、白三烯、前列腺素以及黏附因子等的致炎作用减弱, 从而减少角膜上皮的增生和细胞外基质含量, 起到防止屈光回退的作用。由此可见, 酮咯酸氨丁三醇和皮质类固醇激素在防止屈光回退的作用机制上可能有一些相似性。

综上所述, 本研究证实了酮咯酸氨丁三醇对角膜细胞的增殖有抑制效应, 并且高浓度时可明显减少纤连蛋白的含量, 从而具有防止屈光回退的作用。同时酮咯酸氨丁三醇和皮质类固醇激素在防止屈光回退的作用机制上可能有一些相似性, 因此, 本研究还可为二者合用可以产生协同效应^[10]以及临床上减少激素的用量提供实验依据。但尚需进一步的实验证实。

参 考 文 献

- 1 Park CK, Kim J H . Comparison of wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 1999,25(6):842
- 2 Wilson, Steven E, Mohan Rahul R, Hong Jong-Wook etal The Wound Healing Response After Laser In Situ Keratomileusis and Photorefractive Keratectomy: Elusive Control of biological Variability and Effect on Custom Laser Vision Correction. *Arch Ophthalmol* 2001,119(6):889-896
- 3 汤为学,程艳平,骆云鹏,顺铂,5-氟尿嘧啶,长春新碱配伍对人肝癌细胞株 (7721) 的相互作用. *中国临床新药杂志*,1998,7: 5-9
- 4 黄平. 非甾体抗炎药与大肠癌的预防. *国外医学外科学分册*, 1997,24:215-217
- 5 Nguyen -K-D; Lee -D-A. Effect of steroids and nonsteroidal anti-inflammatory agents on human ocular fibroblast. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992 Aug; 33(9): 2693-701
- 6 Jester JV, Barry PA, Lind GJ. Corneal keratocytes In situ and vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994 35:730-743
- 7 王铮, 李绍珍, 陈家祺, 等. 准分子激光角膜切削术后角膜创面的愈合及皮质类固醇对愈合的影响. *中华眼科杂志*, 1996, 32 (4): 247
- 8 Shaikh, Naazli M ,Hayes, Brian C, Kaufman, Stephen C. Ketorolac for the Regression of Myopic LASIK Overcorrection. *Cornea* 2004, 23(4):339-344
- 9 王晓雄, 喻长春, 蔡明高等. 酮咯酸氨丁三醇对兔眼准分子激光角膜切削术后角膜雾状混浊的作用. *湖北医科大学学报*, 2000, 21: 165-167
- 10 杨新光, Paul UF, Klaus DT. 现代眼科药物治疗学. 第 1 版. 北京:人民军医出版社,1990.53-54

(收稿时间: 2006-07)