

曲安奈德对 PVR 中增殖细胞抑制效果的观察

冷云霞, 张柳, 高宗银, 杨为中

基金项目: 广州市科技局基金资助项目 (No. 11C33150706)
作者单位: (510180) 中国广东省广州市第一人民医院眼科
作者简介: 冷云霞, 博士, 主治医师, 研究方向: 青光眼、眼底病。
通讯作者: 杨为中, 硕士, 主任, 主任医师, 研究方向: 白内障、青光眼、眼底病. leng0829@163.com
收稿日期: 2012-01-09 修回日期: 2012-02-09

Inhibition effect of triamcinolone acetonide on proliferative cells in PVR

Yun-Xia Leng, Liu Zhang, Zong-Yin Gao, Wei-Zhong Yang

Foundation item: Guangzhou Science and Technology Bureau Foundation, China (No. 11C33150706)
Department of Ophthalmology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China
Correspondence to: Wei-Zhong Yang, Department of Ophthalmology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China. leng0829@163.com
Received: 2012-01-09 Accepted: 2012-02-09

Abstract

- **AIM:** To compare the inhibition ratio of different concentration triamcinolone acetonide (TA) on retinal pigment epithelium (RPE) cells, retinal glial (RG) cells and epiretinal membrane (ERM) cells, and find the lowest effective concentration for ERMs cells up to maximum inhibition rate to guide clinical PVR prevention
- **METHODS:** Effect of TA with different concentration (0.8, 0.6, 0.4, 0.3, 0.2, and 0.1 mg/mL) on RPE cells, RG cells, and ERMs cells cultured *in vitro* was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.
- **RESULTS:** Three kinds of cells needed TA with different concentration when they got the maximum inhibition ratio. The lowest effective concentration for RPE cell was 0.4 mg/mL, that for ERMs cell was 0.8 mg/mL and for RG cell was 0.6 mg/mL. Inhibition ratio and time of drug action were positively related.
- **CONCLUSION:** TA can inhibit all kinds of cellular proliferation; but the concentration is different for three kinds of cells. The ERMs cells need higher concentration than RPE and RG cells.
- **KEYWORDS:** epithelium membrane cells; inhibition test *in vitro*; triamcinolone acetonide

Leng YX, Zhang L, Gao ZY, et al. Inhibition effect of triamcinolone acetonide on proliferative cells in PVR. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(4):647-649

摘要

目的: 探讨不同浓度曲安奈德对体外培养的视网膜前膜细胞、视网膜色素上皮细胞 (RPE) 及神经胶质细胞的抑制率差异, 找出视网膜前膜细胞达最大抑制率时的最低有效药物浓度, 用于指导临床外伤性增生性玻璃体视网膜病 (PVR) 防治。

方法: 用四唑盐 (MTT) 比色法检测不同浓度曲安奈德 (TA) 对体外培养的视网膜前膜细胞、RPE 及神经胶质细胞的作用。

结果: 三种细胞对 TA 的反应不完全相同, 其中视网膜前膜细胞达最大抑制率时所需要 TA 的最低有效药物浓度为 0.8 mg/mL, RPE 细胞最大抑制率所需 TA 最低有效药物为 0.4 mg/mL, 神经胶质细胞最大抑制率所需 TA 最低有效药物为 0.6 mg/mL; 且抑制率与药物作用时间呈正相关性。

结论: TA 能够有效抑制体外培养的视网膜前膜细胞、RPE 细胞及神经胶质细胞的增生; 抑制视网膜前膜细胞增殖所需 TA 药物浓度明显高于 RPE 和神经胶质细胞。

关键词: 视网膜前膜细胞; 体外抑制试验; 曲安奈德
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.04.14

冷云霞, 张柳, 高宗银, 等. 曲安奈德对 PVR 中增殖细胞抑制效果的观察. *国际眼科杂志* 2012;12(4):647-649

0 引言

曲安奈德 (triamcinolone acetonid, TA) 作为一种长效皮质类固醇激素自 1980 年代初开始应用于增殖性玻璃体视网膜疾病的治疗, 近年来尤其多与玻璃体手术联合应用于视网膜脱离及增生性玻璃体视网膜病 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 的防治与研究, 引起各位学者的广泛关注。大量的动物试验及临床应用病例报道证实了曲安奈德的低毒性和眼内注药的安全性, 及药物作用的长效性, 但在药物的使用剂量方面并不一致, 一般眼内一次用药有 1, 4, 8 mg 等多个剂量, 另有相关文献报道德国采用的剂量为 25 mg 眼内注射亦未见明显的毒副作用。本研究使用体外培养的视网膜前膜细胞与单纯 RPE 及视网膜神经胶质细胞同时进行 TA 的药物抑制试验, 以期获得更接近于临床的 PVR 治疗最有效的最低有效药物浓度, 使其在临床应用中 PVR 的防治更有效更安全。

1 对象和方法

1.1 对象 细胞培养: 视网膜前膜细胞来源于 PVR 患者玻璃体手术中获取的视网膜前膜组织培养至第四代的细胞成份; 视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE) 及神经胶质细胞来自于供者为 24 ~ 40 岁死者的眼球, 死亡时间 < 24 h, 传代培养至第四代时的细胞, 视网膜前膜采用前膜铺片的原代培养方法^[1], RPE 及神经胶质细胞采用传统贴壁培养法^[2,3]。所使用细胞均经过形态学观察和免疫组织化学技术鉴定^[1]。

1.2 方法 四唑盐(MTT)比色实验:常规消化细胞,用含150mL/L胎牛血清的DMEM-F12培养液制成单细胞悬液,接种于96孔培养板,每孔细胞数约 5×10^3 个。每种细胞每次分为7组,即根据TA的6种浓度分为0.1,0.2,0.3,0.4,0.6,0.8mg/mL 6组和空白对照组。每种细胞每次接种3个96孔板,每板接种21孔,接种后置37℃ CO₂恒温孵育箱中孵育24h,取出培养板加入不同浓度的TA混悬液,每种浓度每板加入3个复孔,再置37℃ CO₂恒温孵育箱中孵育。分别于加药后24,48,72h时各取出一板加MTT溶液(5g/L)20μL,继续培养4h,弃上清,每孔加入150μL二甲基亚砜,振荡10min,在酶联免疫仪570nm波长测光吸收值,并做记录。取各组在24,48,72h时三复孔的平均OD值,根据以下公式:抑制率=(空白对照组平均OD-处理组平均OD)/空白对照组平均OD,计算出各组在24,48,72h时的抑制率,得到3个时间点的3组抑制率值。每种细胞成份重复以上程序3次。

统计学分析:使用SPSS 13.0统计学处理软件,对不同浓度药物作用的抑制率进行配对t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

将以上每种细胞3次试验结果的抑制率根据以上3个时间点分为3组进行均数和标准差的分析,并作抑制率曲线,每种细胞得3条抑制率曲线。不同浓度TA分别在24,48,72h时对RPE抑制率的均数和标准差见表1。0.4mg/mL TA与0.2mg/mL组间抑制率有统计学意义($P < 0.05$)。分析以上结果可认为浓度为0.4mg/mL TA是RPE达最大抑制率时的最低有效药物浓度。其抑制率曲线见图1,表现与上述统计学分析结果基本相符。

不同浓度TA分别在24,48,72h时对视网膜神经胶质细胞的抑制率见表2。48h时0.1mg/mL组与0.6,0.8mg/mL抑制率有显著性组间差异($P < 0.05$),72h时0.1,0.2,0.3mg/mL组与0.6,0.8mg/mL组间抑制率有统计学意义($P < 0.05$),0.6mg/mL与0.8mg/mL组之间无统计学意义($P > 0.05$)。分析以上结果可认为体外培养视网膜神经胶质细胞达最大抑制率时的最低有效TA药物浓度为0.6mg/mL。其抑制率曲线见图2:可见药物在较低浓度0.1~0.3mg/mL之间变化时,抑制率与药物作用时间的长短无明显相关性;而在较高浓度0.4~0.8mg/mL之间变化时,作用48h后的抑制率轻微高于72h后的抑制率,且浓度达0.6mg/mL后曲线趋于平缓。以上分析结果提示TA对视网膜神经胶质细胞的抑制率与药物作用时间的长短没有明显的相关性。

不同浓度TA分别在24,48,72h时对视网膜前膜细胞的抑制率见表3。48h时0.4mg/mL组与0.1mg/mL组抑制率有组间差异($P < 0.05$);72h时0.8mg/mL组与0.2mg/mL组组间抑制率有显著性差异($P < 0.05$)。分析以上结果可认为体外培养视网膜前膜细胞达最大抑制率时的最低有效TA药物浓度应 ≥ 0.8 mg/mL。其抑制率曲线见图3,分析曲线见最大抑制率为72.7%,出现在浓度为0.8mg/mL的药物作用72h时;各时间点曲线均显示药物浓度在0.2~0.6mg/mL之间变化时抑制率呈缓慢上升趋势,而当药物浓度升高到0.8mg/mL时抑制率又有明显增加,与上述的统计学分析结果基本相符。

表1 不同浓度TA作用后3个时间点RPE抑制率的变化

TA 浓度值	24h	48h	72h
0.1mg/mL	0.010778	-0.06225	0.298221
0.2mg/mL	0.337794	0.386656	0.405835
0.3mg/mL	0.411357	0.390899	0.468598
0.4mg/mL	0.50833	0.546909	0.563642
0.6mg/mL	0.520142	0.430595	0.530771
0.8mg/mL	0.505665	0.49159	0.450744

表2 不同浓度TA作用后3个时间点神经胶质细胞抑制率的变化

TA 浓度值	24h	48h	72h
0.1mg/mL	0.076754	-0.06584	0.173984
0.2mg/mL	0.178493	0.126098	0.204645
0.3mg/mL	0.330984	0.189716	0.217937
0.4mg/mL	0.357926	0.440827	0.373834
0.6mg/mL	0.375627	0.551783	0.516582
0.8mg/mL	0.404449	0.513953	0.50206

表3 不同浓度TA作用后3个时间点视网膜前膜细胞抑制率的变化

TA 浓度值	24h	48h	72h
0.1mg/mL	-0.65962	0.073831	0.167792
0.2mg/mL	0.012524	0.299668	0.475834
0.3mg/mL	0.233657	0.308834	0.580057
0.4mg/mL	0.176126	0.407472	0.586559
0.6mg/mL	0.237677	0.271114	0.607865
0.8mg/mL	0.427051	0.386122	0.727342

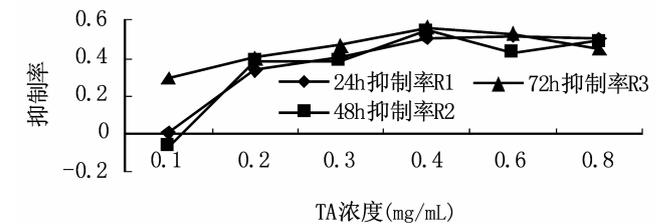


图1 RPE-TA 平均抑制率。

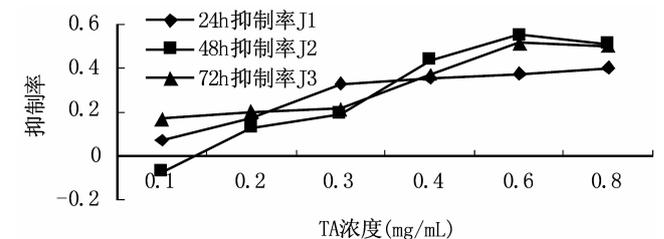


图2 胶质细胞-TA 平均抑制率。

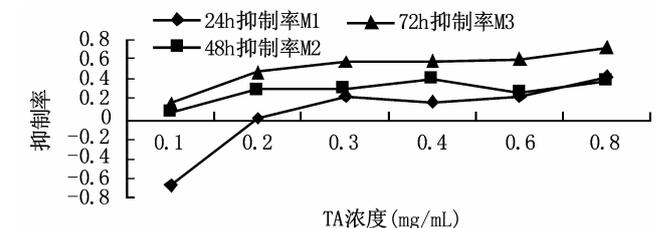


图3 前膜细胞-TA 平均抑制率。

3 讨论

近 20a 来,随着眼底外科技术的迅速发展,我国玻璃体视网膜病的治疗亦取得了可喜的成果。眼外伤、视网膜脱离、眼内炎症、视网膜供血障碍、玻璃体积血、PVR 等严重眼内疾病均可通过玻璃切除、膜剥离、重水置换、气体/硅油眼内填充及眼内光凝、巩膜外冷冻等手术处理方式来清除混浊病变的玻璃体及解除牵拉达到较高的治愈率。但手术本身并不能阻止 PVR 的再次发生,原始疾病及手术操作的损伤均可导致血-视网膜屏障的破坏,RPE 及视网膜神经胶质细胞向视网膜表面及玻璃体腔内游离,再次形成视网膜前膜导致牵拉性视网膜脱离复发^[4]。为提高玻璃体视网膜手术的一次成功率,减少 PVR 的发生或复发,国内外不少学者从抑制炎症反应、抗代谢、抗细胞增殖等多个方面使用多种药物进行了大量的动物试验和体外培养细胞的药物抑制,以期寻找一种理想的药物来弥补手术治疗的不足,达到较好的一次性手术成功率。从 PVR 的发生发展机制的研究结果可以看出,PVR 的早期是炎症反应剧烈和细胞增殖活跃的时期,且这一时期多持续较长可达 3mo 以上。因此理想的 PVR 抑制药物应具备以下多个方面的特点:(1)可减轻血管的渗出降低炎症反应的细胞和体液因子的游走和趋化作用;(2)可抑制诸如 RPE、视网膜神经胶质细胞及成纤维细胞等各种细胞成分的增殖,抑制肉芽组织的形成;(3)可在玻璃体腔内存留较长时间;(4)大剂量玻璃体腔用药时药物毒性低,不会造成正常眼内及视网膜组织的损伤。而曲安奈德(TA)作为一种长效皮质类固醇激素则可满足以上要求,因此成为近年来 PVR 防治研究的热点药物。研究表明皮质类固醇的玻璃体腔局部应用可有效减少牵引性视网膜脱离的发生^[5]。在尝试曲安奈德玻璃体腔局部用药的动物试验中则显示 TA 可在玻璃体腔内存留达 6wk 以上^[6],且可有效的抑制眼内炎症反应的发生。但其在临床应用剂量上仍存在着广泛的争议,且部分报道显示临床应用浓度差异较大。

我们根据前期已进行的视网膜前膜细胞培养及免疫组织化学鉴定结果:培养的视网膜前膜细胞中以 RPE 及神经胶质细胞为主的特点;选用了纯化的 RPE 及视网膜神经胶质细胞与培养得到的视网膜前膜细胞进行不同浓度 TA 的药物抑制对照试验。其中 TA 浓度的选择主要依据单纯 RPE 细胞的抑制试验的结果和文献报道的各种药物浓度而设定^[7]。

采用 MTT 法测定不同浓度药物作用下各个孔内最终光吸收值,间接反应了药物作用下细胞的生长抑制和细胞凋亡情况。其基本原理为细胞凋亡与线粒体功能受损有

关^[8],MTT 分子中四氮唑环可与活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶作用而被还原,死细胞无此功能;因此 MTT 法可以间接反映细胞存活与增生的情况^[9]。

我们通过 MTT 法进一步证实了随着 TA 浓度的增加和作用时间的延长,其对各种细胞的增生抑制作用就会越明显。即各种细胞的生长抑制率的上升在一定程度上与药物浓度和药物作用时间呈正相关。进一步分析试验结果发现达到视网膜前膜细胞最大抑制率所需要的最低有效药物浓度($\geq 0.8\text{mg/mL}$)远高于单纯 RPE(0.4mg/mL)及神经胶质细胞(0.6mg/mL)达最大抑制率时的最低有效药物浓度;且药物对前膜细胞的最大抑制率亦大于对 RPE 及神经胶质细胞的抑制率。从一定程度上说明视网膜前膜细胞的活性较之单纯 RPE 及神经胶质细胞要强;达到有效抑制率所需要的药物浓度要高。

本实验表明 TA 能够有效抑制体外培养的视网膜前膜细胞、RPE 细胞及神经胶质细胞的增殖,因此通过玻璃体腔内注射 TA 或联合玻璃体切割手术是预防和治疗 PVR 的有效方法,临床使用时应在安全浓度的范围内应适当加大给药剂量,以期获得更好的治疗效果。

参考文献

- 1 冷云霞,张少冲,郑健梁,等.增殖性玻璃体视网膜病变视网膜前膜体外培养及免疫组化鉴定.中国实用眼科杂志 2008;10(10):1157-1160
- 2 郑健梁,张洁,郭彦,等.人眼视神经星形胶质细胞的体外培养及鉴定.中华眼底病杂志 2001;17(2):144-146
- 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(7):407-409
- 4 Girardn P, Mimoun G, Karpouzias I, et al. Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. *Retina* 1994;14(5):417-424
- 5 Antoszyk AN, Gottlieb JI, Machemer R, et al. The effects of intravitreal triamcinolone acetate on experimental preretinal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231(1):34-40
- 6 Chandler DB, Hida T, Sheta S, et al. Improvement in efficacy of corticosteroid therapy in an animal model of proliferative vitreoretinopathy by pretreatment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987;225(4):259-265
- 7 Yeung CK, Chan KP, Chan CK, et al. Cytotoxicity of triamcinolone cultured human retinal pigment epithelial cells: comparison with dexamethasone and hydrocortisone. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48(3):236-242
- 8 姜泊,谭晓华,许岸高,等.细胞凋亡基础与临床.北京:人民军医出版社 1999:119-142
- 9 李秋营,宋补昌,姚汝琳,等.MTT 还原法与 BrdU 标记法检测 2BS 增殖活性比较.山西医科大学学报 2002;33(1):79-80