

小檗碱调节翼状胬肉成纤维细胞增殖能力的机制研究

陈 静¹, 李 威², 匡洪影³, 樊锐锋⁴, 孙 河⁵

引用:陈静,李威,匡洪影,等.小檗碱调节翼状胬肉成纤维细胞增殖能力的机制研究.国际眼科杂志 2020;20(1):21-26

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No.81503610);黑龙江中医药大学优秀创新人才基金项目(No.2018jc05)

作者单位:(150040)中国黑龙江省哈尔滨市,黑龙江中医药大学附属第一医院¹外二科;²中药药理实验室;³妇二科;⁵眼科;⁴(150040)中国黑龙江省哈尔滨市,黑龙江中医药大学药学院
作者简介:陈静,毕业于黑龙江中医药大学,在读博士研究生,主治医师,研究方向:中西医结合治疗眼表疾病。

通讯作者:孙河,毕业于黑龙江中医药大学,主任医师,教授,研究方向:针药并用治疗视神经萎缩和眼表疾病.1323177129@qq.com

收稿日期:2019-04-01 修回日期:2019-12-04

摘要

目的:探讨小檗碱对体外培养翼状胬肉成纤维细胞增殖能力的影响及可能的作用机制。

方法:通过对手术获取的翼状胬肉组织进行培养,获取翼状胬肉成纤维细胞。采用不同终浓度(0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)小檗碱对细胞进行诱导,检测小檗碱诱导后翼状胬肉成纤维细胞凋亡水平、线粒体膜电位和凋亡相关因子 mRNA 与蛋白表达水平变化。

结果:小檗碱能够以剂量依赖的方式提高体外培养翼状胬肉成纤维细胞线粒体去极化水平、细胞凋亡比率、促凋亡基因 Bax 和 Bad mRNA 与蛋白的表达水平,降低 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达水平。

结论:小檗碱可能通过提高体外培养翼状胬肉细胞线粒体去极化水平诱导胬肉细胞发生凋亡。

关键词:翼状胬肉;小檗碱;细胞凋亡;线粒体去极化

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.1.05

Mechanism of berberine on the proliferation of pterygium fibroblasts

Jing Chen¹, Wei Li², Hong-Ying Kuang³, Rui-Feng Fan⁴, He Sun⁵

Foundation items: National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation Project (No.81503610); The Outstanding Talents Funding Project of Heilongjiang University of Chinese Medicine (No.2018jc05)

¹Second Department of Surgery; ²Pharmacology Laboratory of Chinese Medicine; ³Second Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine,

Harbin 150040, Heilongjiang Province, China; ⁴Department of Medicinal Botany, College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China; ⁵Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: He Sun. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. 1323177129@qq.com

Received:2019-04-01 Accepted:2019-12-04

Abstract

• AIM: To investigate the effect of berberine on proliferation of *in vitro* pterygium fibroblasts and its possible mechanism.

• METHODS: Pterygium fibroblast obtained from cultured pterygium tissue after surgical excision. Pterygium fibroblasts cells apoptosis level, mitochondrial membrane potential and apoptosis-related factors mRNA and protein expression levels were detected after the induction of berberine with different final concentrations (0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$).

• RESULTS: Berberine increased the mitochondrial depolarization level, apoptosis rate, expression level of pro-apoptotic gene Bax, Bad mRNA and protein, and decreased the expression level of Bcl-2 gene mRNA and protein *in vitro* pterygium fibroblasts cells in a dose-dependent manner.

• CONCLUSION: Berberine may induce *in vitro* cultured pterygium cell apoptosis by increasing mitochondrial depolarization.

• KEYWORDS: pterygium; berberine; cell apoptosis; mitochondrial depolarization

Citation: Chen J, Li W, Kuang HY, et al. Mechanism of berberine on the proliferation of pterygium fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(1):21-26

0 引言

翼状胬肉中医称“胬肉攀睛”,表现为结膜下良性纤维结缔组织增生,可覆盖至瞳孔区而严重影响视力,是户外工作人群易发的、对患者生存质量影响严重的眼表疾病^[1]。翼状胬肉的发生与环境中的微尘颗粒(PM_{2.5}等)刺激有关,随着环境污染和PM_{2.5}对人类活动影响的加剧,对此类眼表疾病的发生亦起到推动作用^[2]。目前翼状胬肉治疗方式以手术治疗为主,但术后的复发率高达20%~70%^[3],且缺乏有效药物控制胬肉的术后复发。依

表1 引物序列

基因名称	引物序列	产物大小(bp)	GeneBank
Bcl-2	上游引物: TGTGTGTGGAGAGCGTCAAC 下游引物: CACCAAGTGCACCTACCCA	132	NM_000657.2
Bad	上游引物: ACTGAGGTCCTGAGCCGACA 下游引物: CGGCTCAAACCTCTGGGATCTG	224	NM_004322.3
Bax	上游引物: GGGTTGTGCGCCCTTTTCTAC 下游引物: CTGGAGACAGGGACATCACT	198	NM_001291428.1
Bcl-xl	上游引物: CACAGCAGCAGTTTGGATGC 下游引物: TTACCCCATCCCGGAAGAGT	196	NM_138578.3
β -actin	上游引物: TTCCAAATATGAGATGCGTTGTTA 下游引物: ATGCTATCACCTCCCTGTG	119	NM_001101.5

据胥肉攀睛“心肺风热、脾胃实热、虚火上炎”的发病机制,具有“清热燥湿、泻火解毒”作用的黄连在中医治疗胥肉攀睛的经典方剂中广泛应用^[4-6]。而对黄连主要成分小檗碱的药理机制研究表明,小檗碱在多种类型细胞中都能够诱导细胞凋亡^[7-8]。翼状胥肉成纤维细胞的异常增生是造成胥肉组织形成和复发的关键,如果小檗碱能控制胥肉细胞的增殖或凋亡,将对翼状胥肉的预后起到有益的作用。故本研究使用小檗碱对体外培养的翼状胥肉成纤维细胞进行干预,观察小檗碱对人翼状胥肉成纤维细胞凋亡的影响和凋亡相关因子的表达变化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 取材 翼状胥肉组织由黑龙江中医药大学附属第一医院眼科翼状胥肉患者手术切取获得。研究方案经黑龙江中医药大学附属第一医院伦理委员会审查备案(文件号:HZYLLBA201901)。获取样本前,已经充分与患者进行知情同意沟通。

1.1.2 药物和试剂 实验用小檗碱(上海源叶生物科技有限公司, CAT: B21379)、分散酶(Sigma, CAT: D4693)、胰酶(Gibco, CAT: 2520056)、小鼠抗人波形蛋白抗体(Proteintech, CAT: 60330-1-Ig)、兔抗角蛋白抗体(Proteintech, CAT: 26411-1-AP)、CCK8试剂盒(Solarbio, CAT: CA1210)、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术, CAT: C1062M)、SYBR Green染料试剂盒(Roche, CAT: 04913914001)、线粒体膜电位检测试剂盒(碧云天生物技术, CAT: C2006)。

1.1.3 主要实验仪器 Allegra X-30 超速冷冻离心机(美国 Beckman)、M7000 荧光显微镜(美国 EVOS)、LC480 实时定量 PCR 仪(美国 Roch)、ELX800 全自动酶标仪(美国 Biotek)。

1.2 方法

1.2.1 翼状胥肉成纤维细胞的培养和鉴定

1.2.1.1 翼状胥肉成纤维细胞的体外培养 临床手术切除的翼状胥肉组织保存于生理盐水中,1h内带回实验室进行操作。胥肉组织经 pH=7.4 的 PBS 冲洗 3 次后用 PBS 配制的终浓度 50 μ mol/L 分散酶 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。随后剪碎胥肉组织,同时加入 2.5g/L 胰酶 37 $^{\circ}$ C 消化 5min,使用移液器吹散组织块充分释放单细胞。使用孔径为 40 μ m 的细胞筛网对细胞悬液进行过滤,将分离后的细胞使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下进行培养,2~3d 更换培养液 1 次,稳定传代 3~5 次后用于后续研究。

1.2.1.2 人翼状胥肉成纤维细胞的鉴定 稳定生长的翼状胥肉细胞经 2.5g/L 胰酶消化后接种于 24 孔培养板中,待细胞生长铺满板底 70% 左右面积时,移除培养液并使用 4% 多聚甲醛对细胞进行固定。固定后的细胞经 0.5% Triton X-100 室温透膜 30min 和 5% BSA 室温封闭 1h 后加入用 5% BSA 稀释的含有 1% 小鼠抗人波形蛋白单抗和 1% 兔源角蛋白多抗的一抗混合物,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。孵育结束后 PBS 清洗 3 次,加入 5% BSA 稀释的含 1% FITC 标记的山羊抗小鼠二抗及 1% TRITC 标记的山羊抗兔二抗混合物,室温孵育 30min 后,经 PBS 洗涤和 DAPI 复染后,使用荧光显微镜,观察发射波长 530nm 波形蛋白表达情况和发射波长 630nm 角蛋白表达情况。同时以人宫颈癌上皮细胞(Hela 细胞)作为荧光染色的阳性对照。

1.2.2 小檗碱药物作用浓度的确定 实验用小檗碱使用 DMSO 配制成浓储液。正式实验前,使用 96 孔板培养翼状胥肉成纤维细胞,将初始细胞浓度调整为 1 \times 10³ cells/mL,待细胞贴壁生长后,按照浓度梯度分别向培养液中加入终浓度为 10、20、40、80、160 μ mol/L 的小檗碱,每组设 4 个复孔。待培养 24h 后,移除培养液并使用 PBS 清洗细胞 3 次后,每个培养孔中加入 100 μ L CCK8 反应液,5% CO₂ 孵育 37 $^{\circ}$ C 条件孵育 1h 后,使用酶标仪测定 450nm 波长处吸光度值(OD 值)。使用 GraphPad Prism 7.0 软件对所获得的小檗碱浓度梯度处理后各组细胞的光吸收值进行非线性分析,得到小檗碱培养翼状胥肉成纤维细胞 24h 的 IC₅₀ 值为 83.22 μ mol/L,在后续研究中我们以 IC₅₀ 值为参考进行小檗碱药物浓度的设定。

1.2.3 实验分组和药物处理 我们将体外培养的翼状胥肉成纤维细胞随机分为 4 组,对照组为不加小檗碱的正常细胞,以小檗碱 IC₅₀ 浓度为最高浓度处理组(80 μ mol/L),并按照浓度梯度 50% 递减的原则设立中间浓度 40 μ mol/L 和低浓度 20 μ mol/L 处理组。所有细胞中均加入等量的用于溶解小檗碱的 DMSO,各组细胞培养 24h 后,收集细胞用于后续检测。

1.2.4 各组翼状胥肉成纤维细胞凋亡比率检测 各组细胞培养 24h 后,使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒按照试剂盒推荐步骤,对细胞进行染色后使用流式细胞仪检测细胞凋亡比率。

1.2.5 各组翼状胥肉成纤维细胞实时定量 PCR 检测 各组细胞在培养结束后使用 Trizol 法抽提细胞内总 RNA,使用反转录酶对 mRNA 进行反转录后,使用 SYBR Green 染

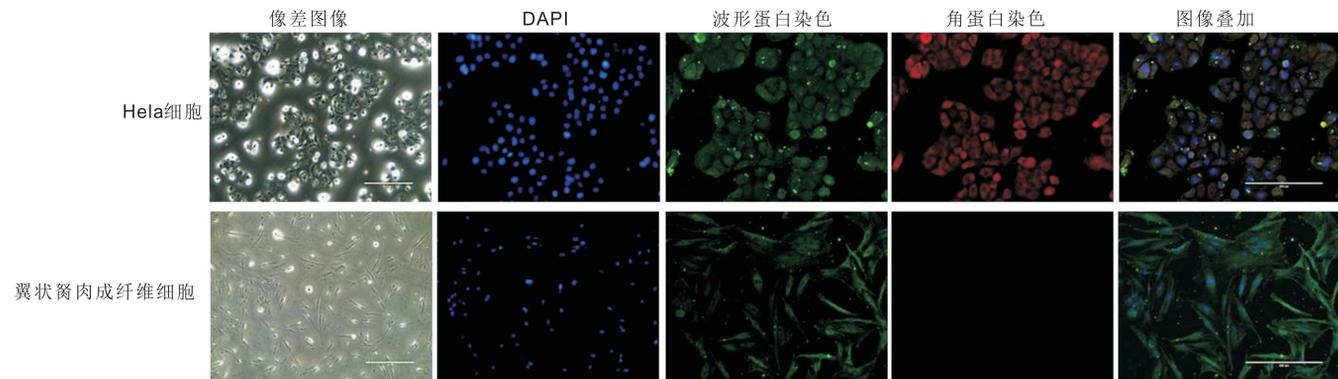


图1 体外培养翼状胥肉成纤维细胞的鉴定($\times 100$)。

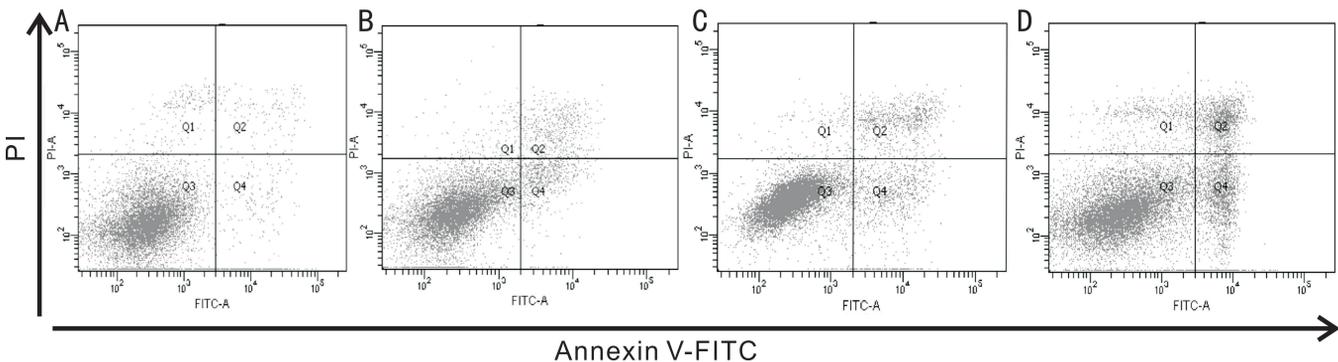


图2 流式细胞术检测翼状胥肉成纤维细胞凋亡水平 A:对照组;B:20 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱组;C:40 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱组;D:80 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱组。

料法和 LC480 实时定量荧光 PCR 仪对目标基因进行扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目标基因的相对表达水平,所检测指标的具体引物序列见表 1。

1.2.6 各组翼状胥肉成纤维细胞 Western blot 检测 各组翼状胥肉细胞使用 RIPA 裂解液冰浴状态下裂解,按每组每个指标 50 μg 总蛋白的标准经 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后,采用半干转印的方式 (20V, 40min) 将凝胶中的蛋白转印至 PVDF 膜上, PVDF 膜经 TBST 漂洗 3 次后, 5% 脱脂牛奶封闭, 分别应用封闭液配制的兔源多克隆抗 Bcl-2 抗体 (Abcam, CAT: ab196495, 1:2000)、兔源多克隆抗 Bad 抗体 (Abcam, CAT: ab90435, 1:2000)、兔源单克隆抗 Bax 抗体 (Abcam, CAT: ab182733, 1:2000) 及小鼠源单克隆抗 β -actin 抗体 (Santa Cruz, CAT: sc-70319, 1:2000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。过夜孵育后, 使用 TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次, 每次 5min。随后除 β -actin 加入山羊抗小鼠 HRP 标记的 IgG 二抗 (中杉金桥, CAT: ZB-2305, 1:5000), 其余因子均加入山羊抗兔 HRP 标记的 IgG 二抗 (中杉金桥, CAT: ZB-2301, 1:5000) 室温孵育 1h 后, 加入 ECL 发光液, 使用 GelDoc EZ 凝胶成像系统 (美国 BioRad) 进行放射自显影检测, 所获得的图像经软件分析密度与面积, 目标蛋白的相对表达水平 = (目标基因密度 \times 面积) / (同组 β -actin 密度 \times 面积)。

1.2.7 各组翼状胥肉成纤维细胞线粒体膜电位检测 (JC-1 染色) 线粒体膜电位染色使用线粒体膜电位检测试剂盒按照推荐步骤进行操作, 并使用荧光显微镜对 JC-1 染色后细胞 530nm 绿色荧光和 590nm 红色荧光信号进行拍照镜检; 同时使用流式细胞仪以 530nm 荧光为横轴, 590nm 荧光为纵轴对检测结果进行分析。圈选对照组细胞分布集中区域设定为未发生去极化的正常细胞, 并同一标准对不同浓度小檗碱处理后的细胞进行圈选, 比较

圈选范围内未发生去极化细胞比率的差异。

统计学分析: 实验数据经 SPSS20.0 软件分析后, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Dunnett's T3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养翼状胥肉成纤维细胞鉴定 HeLa 细胞、体外培养翼状胥肉细胞的波形蛋白和角蛋白染色结果见图 1。体外培养翼状胥肉成纤维细胞波形蛋白染色阳性, 角蛋白染色阴性, 符合成纤维细胞的蛋白表达特征。HeLa 细胞作为阳性对照, 其角蛋白和波细胞形蛋白都呈现阳性结果, 说明荧光双染的鉴定方案可行。荧光染色结果证明, 所培养的细胞确定为成纤维细胞, 且纯度较高, 可用于后续研究。

2.2 细胞凋亡比率检测结果 各组细胞采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂染色并经流式细胞仪检测后的结果见图 2, 经流式细胞仪检测后 Q1 象限为死亡细胞, Q2 象限为晚期凋亡细胞, Q3 象限为正常细胞, Q4 象限为早期凋亡细胞。从结果可以看出, 不同浓度小檗碱处理 24h 后, 四组间凋亡率差异有统计学意义 ($F = 382.75, P < 0.001$), 随着小檗碱浓度的提高, Q2 和 Q4 象限细胞比率逐渐增加, 说明小檗碱以剂量依赖的方式促进细胞凋亡的发生。以 Q2 和 Q4 象限细胞所占比例之和代表细胞凋亡的总比例, 与未加小檗碱的对照组相比, 终浓度 20, 40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱处理后细胞凋亡比率均显著升高 ($P < 0.05$), 并且随着小檗碱浓度的提高, 其凋亡比率呈现明显的剂量依赖趋势 (表 2)。

2.3 凋亡相关细胞因子表达水平检测结果 四组间抗凋亡基因 Bcl-2 的蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义

表2 不同浓度小檗碱处理24h对细胞凋亡和凋亡蛋白表达的影响

组别	凋亡率(%)	蛋白表达水平		
		Bcl-2	Bad	Bax
对照组	5.20±0.42	0.63±0.02	0.26±0.01	0.30±0.01
20μmol/L小檗碱组	7.10±0.77 ^a	0.51±0.02 ^b	0.25±0.01	0.35±0.04
40μmol/L小檗碱组	11.26±1.01 ^b	0.10±0.00 ^b	0.50±0.01 ^b	0.51±0.03 ^b
80μmol/L小檗碱组	21.64±1.02 ^b	0.08±0.02 ^b	0.55±0.04 ^b	0.85±0.05 ^b
<i>F</i>	382.75	717.71	297.51	243.24
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05,^b*P*<0.01 vs 对照组。

表3 不同浓度小檗碱处理24h后未发生线粒体去极化细胞比率和凋亡基因mRNA的表达

组别	未发生线粒体去极化细胞比率(%)	mRNA表达水平			
		Bcl-2	Bcl-xl	Bad	Bax
对照组	70.66±3.21	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
20μmol/L小檗碱组	67.02±3.03	0.65±0.09 ^b	0.88±0.14	0.89±0.07 ^a	0.80±0.07
40μmol/L小檗碱组	56.61±1.66 ^b	0.39±0.08 ^b	0.55±0.07 ^b	1.34±0.07 ^b	1.74±0.05 ^b
80μmol/L小檗碱组	31.69±5.00 ^b	0.16±0.05 ^b	0.48±0.02 ^b	3.97±0.21 ^b	3.22±0.14 ^a
<i>F</i>	130.81	165.10	154.99	851.71	22.48
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05,^b*P*<0.01 vs 对照组。

(*F* = 717.71, *P* < 0.001); 与未加入小檗碱的对照组相比, Bcl-2 蛋白表达水平随着小檗碱终浓度的提高而显著降低, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。与之相对应的是 Bax 和 Bad 这两个促凋亡基因的蛋白表达水平, 四组间 Bax 和 Bad 蛋白水平比较, 差异有统计学意义 (*F* = 243.24, 297.51, *P* < 0.001), 且随着小檗碱浓度的提高而明显增加。对蛋白表达强度的灰度分析表明, 与对照组相比促凋亡因子 Bax 和 Bad 蛋白表达水平随着小檗碱终浓度的提高而逐渐增高, 在 40、80μmol/L 小檗碱处理后翼状胬肉成纤维细胞中 Bax 和 Bad 蛋白表达水平与不加小檗碱的对照组相比均显著升高 (Bax: 20μmol/L, *P* = 0.180; 40μmol/L, *P* < 0.001; 80μmol/L, *P* < 0.001。Bad: 20μmol/L, *P* = 0.218; 40μmol/L, *P* < 0.001; 80μmol/L, *P* < 0.001, 图 3, 表 2)。

凋亡相关因子 mRNA 表达水平的检测结果与蛋白表达水平的趋势类似, 四组间 Bcl-2、Bcl-xl、Bad 和 Bax mRNA 的表达比较, 差异有统计学意义 (*F* = 165.10、154.99、851.71、22.48, *P* < 0.001, 表 3)。随着小檗碱终浓度的提高, 抗凋亡基因 Bcl-2、Bcl-xl mRNA 表达水平与对照组相比呈现出逐渐降低的趋势, 尤其是 40、80μmol/L 小檗碱组中 Bcl-2 和 Bcl-xl mRNA 表达水平与对照组相比均显著降低 (Bcl-2: 20μmol/L, *P* = 0.003; 40μmol/L, *P* < 0.001; 80μmol/L, *P* < 0.001。Bcl-xl: 20μmol/L, *P* = 0.338; 40μmol/L, *P* < 0.001; 80μmol/L, *P* < 0.001), 而促凋亡因子 Bax 和 Bad mRNA 表达水平与对照组相比则呈显著逐渐升高的趋势 (Bax: 20μmol/L, *P* = 0.115; 40μmol/L, *P* < 0.001; 80μmol/L, *P* < 0.001。Bad: 20μmol/L, *P* = 0.017; 40μmol/L, *P* < 0.001; 80μmol/L, *P* < 0.001)。

2.4 细胞线粒体 JC-1 染色结果 在线粒体膜电位较高时, JC-1 聚集在线粒体的基质中, 形成聚合物产生 590nm 红色荧光; 而在去极化状态下即线粒体膜电位较低时, JC-1 不能聚集在线粒体的基质中, 此时 JC-1 为单体, 可

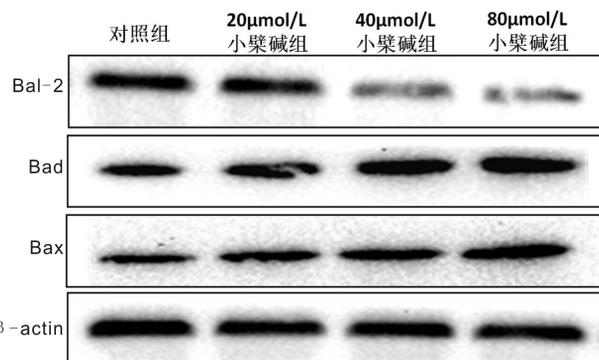


图3 Western blot 检测翼状胬肉成纤维细胞中凋亡蛋白 Bcl-2、Bad、Bax 表达水平。

以产生 530nm 的绿色荧光。结果表明, 随着小檗碱浓度的增加, 细胞内绿色荧光强度逐渐增加, 说明细胞线粒体去极化水平逐渐提高 (图 4A); 流式细胞仪检测结果也表明, 随着小檗碱浓度的提高, 流式细胞检测圈选范围内即 P1 区细胞总体数量显著降低 (图 4B)。对未发生线粒体去极化的翼状胬肉细胞所占比率的统计结果也表明, 四组间差异有统计学意义 (*F* = 130.81, *P* < 0.001, 表 3)。与对照组相比, 随着小檗碱终浓度的提高, 未发生线粒体去极化的正常细胞比率显著降低 (20μmol/L: *P* = 0.413; 40μmol/L: *P* = 0.001; 80μmol/L: *P* < 0.001), 说明小檗碱以剂量依赖的方式对翼状胬肉成纤维细胞线粒体膜电位产生影响。

3 讨论

中医认为翼状胬肉的发病机制与五脏密切相关, 心通过手少阴心经直接与目相连, 心经邪热可直接上扰于目; 眼球暴露于外, 外感风热之邪客于心肺两经, 心肺风热壅盛, 经络瘀滞, 则胬肉胀起; 众人多饮食不节损伤脾胃, 内生湿热壅滞眼络; 过度劳欲, 心阴暗耗, 虚火上炎于目所致。而现代医学认为翼状胬肉是细胞凋亡与增生失衡导

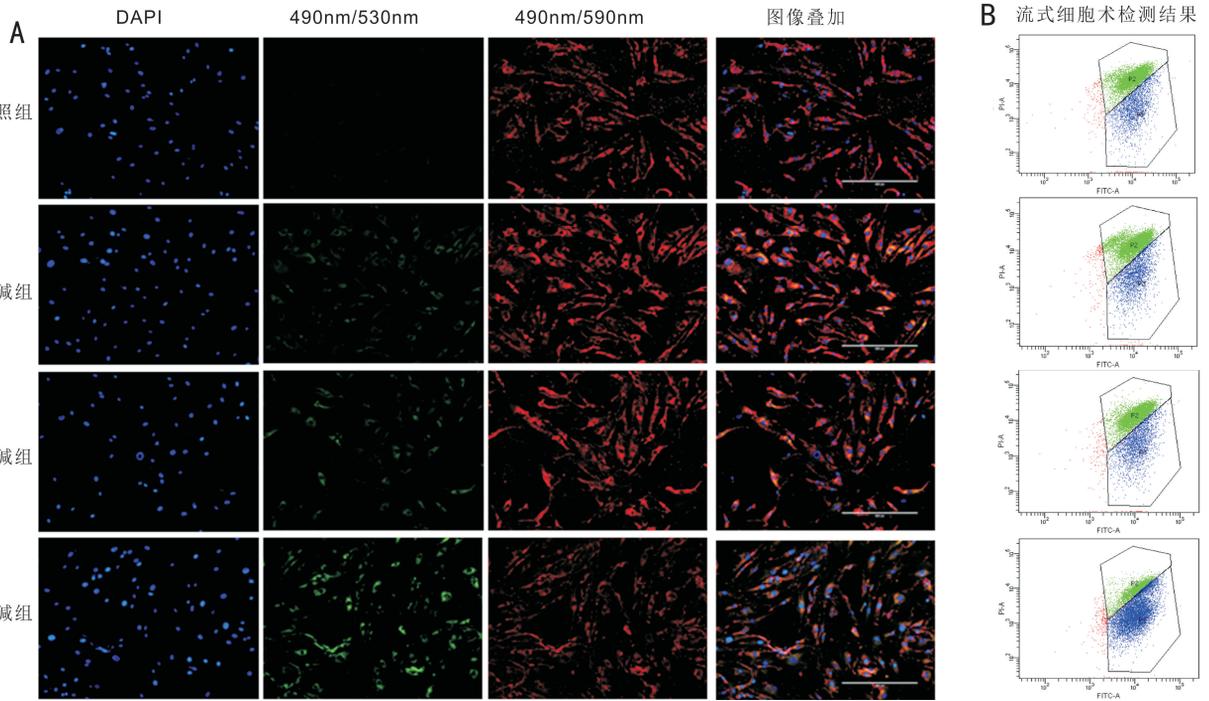


图4 不同终浓度小檗碱作用24h后细胞线粒体去极化情况 A:翼状胥肉成纤维细胞JC-1染色结果($\times 100$); B:流式细胞术检测细胞线粒体去极化结果。

致的增生性眼表疾病,具体发病机制虽较为复杂,但目前公认的是翼状胥肉成纤维细胞异常增生是导致疾病发生的主要原因^[9],而翼状胥肉成纤维细胞与肿瘤细胞存在类似的生物学行为^[10]。对翼状胥肉组织中凋亡相关因子的研究发现,抗凋亡基因 Bcl-2 在翼状胥肉中表达强度明显高于正常结膜组织,且在复发性胥肉中 Bcl-2 基因的表达水平高于初发胥肉^[11-12]。这说明在翼状胥肉成纤维细胞中凋亡基因的表达水平处于异常的状态,通过调控凋亡相关基因的表达水平可能对翼状胥肉细胞的异常增殖起到控制作用。

对小檗碱抑制肿瘤细胞生长的研究表明,在结肠癌和胸腺癌细胞中小檗碱能够通过降低 Bcl-2 的表达水平,诱导肿瘤细胞发生凋亡^[13-14]。而我们对体外培养的翼状胥肉成纤维细胞中凋亡基因 mRNA 和蛋白的表达水平的检测也发现,小檗碱能够下调体外培养的翼状胥肉成纤维细胞中 Bcl-2 和上调 Bax、Bad mRNA 的表达水平,而且对这些凋亡相关因子 mRNA 和蛋白表达水平的调节都呈现出明显的剂量性。细胞凋亡的趋势与 Bcl 家族抗凋亡基因与促凋亡基因的表达比率有关^[15],抗凋亡因子 Bcl-2 的表达量降低和促凋亡因子 Bax、Bad 表达量的提高将可能造成细胞凋亡比率的提升,这一结果也与流式细胞术对细胞凋亡比率的检测结果相一致。Bcl 家族分子则主要分布在线粒体内膜,对线粒体功能的变化较为敏感^[16]。我们前期在人卵巢颗粒细胞(KGN 细胞)的研究结果表明,小檗碱能够通过剂量依赖的方式促进线粒体 SIRT3 因子的泛素化,从而可能对线粒体机能产生影响^[17]。相关研究表明,小檗碱能够在体外培养 HepG2 细胞线粒体局部聚集^[18],而在体外培养的 B 细胞中小檗碱能够以剂量依赖的方式诱导细胞凋亡的发生^[19]。在本研究中,小檗碱以剂量依赖的方式提高了翼状胥肉成纤维细胞的线粒体去极化水平及细胞凋亡比率,我们推测小檗碱抑制翼状胥肉成纤维细胞增殖的药理机制很可能与其对

线粒体功能的调节有关。

线粒体是重要的能量代谢细胞器,线粒体功能的稳定与细胞的存活密切相关。由于线粒体内膜两侧质子不均匀分布产生质子梯度,形成线粒体膜内负外正的电压差,线粒体膜电位是保持线粒体功能正常所必需的^[20]。而当线粒体受到不良因素影响或衰老时线粒体内膜的电压差减小或消失即发生去极化现象,去极化现象预示着线粒体功能的弱化及细胞能量代谢水平的下降,同时线粒体去极化比率提高也是细胞凋亡的早期标志性事件之一^[21]。本研究结果显示,随着培养系统中小檗碱浓度的提高,JC-1 单体绿色荧光强度逐渐增强,说明小檗碱显著降低了线粒体的膜电位。同时流式细胞术的检测结果也表明,随着小檗碱浓度的提高,未发生线粒体去极化的细胞比例也逐渐降低。这些结果表明,小檗碱可能通过影响线粒体膜电位从而启动翼状胥肉成纤维细胞的凋亡机制。

综合以上结果表明,黄连的主要成分小檗碱能够显著提高翼状胥肉细胞线粒体去极化水平、细胞凋亡比率和凋亡相关因子的表达水平。黄连味苦、性寒,入心、脾、胃、肝、大肠经,直泻心肺两经风热,燥脾胃湿热,清心泻火解毒,针对胥肉攀睛“心肺风热,虚火上炎”之病因病机而治本。小檗碱对翼状胥肉成纤维细胞线粒体机能的调节可能一定程度上解释了这一中医理论的生物学机制。同时凋亡相关因子的表达及线粒体去极化水平的检测也显示,线粒体很可能是小檗碱的细胞内作用靶点,通过激活线粒体途径从而诱发细胞凋亡的发生。有研究显示,小檗碱能够抑制线粒体复合体的生物学活性,从而对线粒体功能产生影响,这也从另一个方面印证了线粒体可能是小檗碱的药效靶点^[22]。虽然本研究发现小檗碱促进翼状胥肉成纤维细胞的凋亡,但目前有关小檗碱对不同细胞凋亡调节作用的研究结果并不一致,也有研究表明小檗碱也对线粒体凋亡途径起到抑制作用^[23-24]。我们推测造成小檗碱

对细胞凋亡调节作用的差异可能与小檗碱作用浓度和所研究的细胞类型有关。而我们在翼状胬肉成纤维细胞中发现的小檗碱促进胬肉细胞凋亡的研究结果,为进一步明确中药疗效的药理机制及推动中药在眼表疾病治疗方面的应用提供了有力的数据支持。

参考文献

- 1 Nuzzi R, Tridico F. How to minimize pterygium recurrence rates: clinical perspectives. *Clin Ophthalmol* 2018;12:2347-2362
- 2 Lee KW, Choi YH, Hwang SH, et al. Outdoor Air Pollution and Pterygium in Korea. *J Korean Med Sci* 2017;32(1):143-150
- 3 Rezvan F, Khabazkhoob M, Hooshmand E, et al. Prevalence and risk factors of pterygium: a systematic review and meta-analysis. *Surv Ophthalmol* 2018; 63(5):719-735
- 4 杨新宇,徐蓓蕾,沈芸.黄连羊肝丸中小檗碱百分含量测定.哈尔滨商业大学学报(自然科学版)2015;22(3):267-270
- 5 梅馨,张子强.泻脾除热饮配合白丁香点睛治胬肉攀睛73例.河南中医 2005;5(12):64-65
- 6 江花,王科闯,王明杰,等.《眼科纂要》学术源流研究.中医文献杂志 2015;5(4):5-8
- 7 Dai W, Mu L, Cui Y, et al. Berberine Promotes Apoptosis of Colorectal Cancer via Regulation of the Long Non-Coding RNA (lncRNA) Cancer Susceptibility Candidate 2 (CASC2)/AU-Binding Factor 1 (AUF1)/B-Cell CLL/Lymphoma 2 (Bcl-2) Axis. *Med Sci Monit* 2019;25:730-738
- 8 Srivastava NS, Srivastava RAK. Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/ β -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. *Phytomedicine* 2019;52:117-128
- 9 李石磊,力强,董丽华.翼状胬肉围手术期细节处理的效果观察.国际眼科杂志 2016;16(11):2160-2161
- 10 Cao D, Ng TK, Yip YWY, et al. p53 inhibition by MDM2 in human pterygium. *Exp Eye Res* 2018;175:142-147
- 11 姚亮,柏凌,何娜,等. PI3K/Akt/Bcl-2 信号通路在原发性翼状胬肉中的机制研究.山西医科大学学报 2017;48(5):441-444
- 12 兰榕,郑曦,金辉,等.翼状胬肉40例凋亡抑制因子 BCL-2 表达的检测分析.福建医药杂志 2015;37(5):67-69
- 13 Dai W, Mu L, Cui Y, et al. Berberine Promotes Apoptosis of Colorectal Cancer via Regulation of the Long Non-Coding RNA

- (lncRNA) Cancer Susceptibility Candidate 2 (CASC2)/AU-Binding Factor 1 (AUF1)/B-Cell CLL/Lymphoma 2 (Bcl-2) Axis. *Med Sci Monit* 2019;25:730-738
- 14 Hashemi-Niasari F, Rabbani-Chadegani A, Razmi M, et al. Synergy of theophylline reduces necrotic effect of berberine, induces cell cycle arrest and PARP, HMGB1, Bcl-2 family mediated apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2018;106:858-867
- 15 Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* 2018;25(1):65-80
- 16 Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression. *Cell Death Differ* 2018;25(1):104-113
- 17 Li W, Li D, Kuang H, et al. Berberine increases glucose uptake and intracellular ROS levels by promoting Sirtuin 3 ubiquitination. *Biomed Pharmacother* 2019; 121(6):563-576
- 18 Li Q, Zhou T, Liu C, et al. Mitochondrial membrane potential played crucial roles in the accumulation of berberine in HepG2 cells. *Biosci Rep* 2019;39(4):477-491
- 19 Park GB, Park SH, Kim D, et al. Berberine induces mitochondrial apoptosis of EBV-transformed B cells through p53-mediated regulation of XAF1 and GADD45 α . *Int J Oncol* 2016;49(1):411-421
- 20 李广悦,尹东青,徐凌,等.姜黄素调控脂多糖诱导成骨细胞线粒体功能改变及凋亡研究.重庆医科大学学报 2019;4(5):581-587
- 21 Xiao B, Deng X, Lim GGY, et al. p62-Mediated mitochondrial clustering attenuates apoptosis induced by mitochondrial depolarization. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864(7):1308-1317
- 22 Hou WL, Yin J, Alimujiang M, et al. Inhibition of mitochondrial complex I improves glucose metabolism independently of AMPK activation. *J Cell Mol Med* 2018;22(2):1316-1328
- 23 Pirmoradi Z, Yadegari M, Moradi A, et al. Effect of berberine chloride on caspase-3 dependent apoptosis and antioxidant capacity in the hippocampus of the chronic cerebral hypoperfusion rat model. *Iran J Basic Med Sci* 2019;22(2):154-159
- 24 Paul M, Hemshekhar M, Kemparaju K, et al. Berberine mitigates high glucose-potentiated platelet aggregation and apoptosis by modulating aldose reductase and NADPH oxidase activity. *Free Radic Biol Med* 2019;130:196-205