

# 噻吗心安对人角膜内皮细胞的影响作用研究

樊廷俊, 随蓓蓓, 王清扬, 温 茜, 孙 倩, 于苗苗, 葛 源

基金项目: 国家高技术研究发展 863 计划 (No. 2006AA02A132)

作者单位: (266003) 中国山东省青岛市, 中国海洋大学海洋生命学院角膜组织工程重点实验室

作者简介: 樊廷俊, 男, 理学博士, 教授, 中国海洋大学海洋生命学院副院长, 角膜组织工程重点实验室主任, 国家生命科学与技术人才培养基地主任, 国家细胞生物学教学团队带头人, 山东省高等学校教学名师, 在国际上首次建立了非转染的人角膜内皮、基质和上皮细胞系, 体外重建出了结构和功能正常的组织工程人角膜内皮、上皮和基质等, 研究方向: 细胞工程与角膜组织工程。

通讯作者: 樊廷俊. tjfan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2012-12-05 修回日期: 2013-05-29

## Studies on the effect of timolol maleate on human corneal endothelial cells

Ting-Jun Fan, Bei-Bei Sui, Qing-Yang Wang, Qian Wen, Qian Sun, Miao-Miao Yu, Yuan Ge

**Foundation item:** National High Technology Research and Development Program ("863" Program) of China (No. 2006AA02A132) Key Laboratory for Corneal Tissue Engineering, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

**Correspondence to:** Ting-Jun Fan. Key Laboratory for Corneal Tissue Engineering, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tjfan@ouc.edu.cn

Received: 2012-12-05 Accepted: 2013-05-29

## Abstract

• **AIM:** To examine the effect of timolol maleate, a topical anti-glaucoma drug, on *in vitro* cultured human corneal endothelial (HCE) cells and lay foundations for its secure medication clinically.

• **METHODS:** After *in vitro* cultured HCE cells treated with timolol maleate at different concentrations, the situation of cellular growth, proliferation, and morphology was checked under an inverted light microscope. And plasma membrane permeability, DNA fragmentations, and ultra-structure of HCE cells were detected by acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double fluorescent staining, DNA agarose gel electrophoresis, and transmission electron microscopy (TEM), respectively.

• **RESULTS:** After treated with timolol maleate at concentrations from 0.15625g/L to 5g/L, *in vitro* cultured HCE cells showed typical characteristics of apoptosis, including growth retarding, number decreasing, cytoplasmic shrinking, vacuolation, falling off from well bottom of culture plate, plasma membrane permeability

increasing, chromatin condensation, DNA fragmentation, appearance of apoptotic body, and so on. The apoptosis-inducing effect of timolol maleate was in dose- and time-dependent manners. The greatest apoptosis-inducing effect of timolol maleate on HCE cells was found at the clinic medication concentration of 2.5-5g/L, and their induced apoptotic rate of HCE cells at 28 hours reached 83.23%-96.71%, respectively.

• **CONCLUSION:** Timolol maleate within the concentration of 0.15625-5g/L has an obvious apoptosis-inducing effect on HCE cells, and has tremendous toxicity to HCE cells at clinic medication dosage. Timolol maleate should be carefully utilized in ophthalmic clinic.

• **KEYWORDS:** human corneal endothelial cells; timolol maleate; apoptosis; DNA fragmentation; apoptotic body

**Citation:** Fan TJ, Sui BB, Wang QY, *et al.* Studies on the effect of timolol maleate on human corneal endothelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(6):1069-1072

## 摘要

**目的:** 揭示抗青光眼药物噻吗心安 (timolol maleate) 对体外培养人角膜内皮 (HCE) 细胞的影响作用, 为其眼科临床安全用药提供实验依据。

**方法:** 用不同浓度噻吗心安处理体外培养的 HCE 细胞, 在倒置显微镜下观察细胞的生长、增殖和形态变化, 利用吖啶橙/溴化乙锭荧光双染色法检测质膜的通透性, 利用琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 的断片化, 利用透射电镜观察细胞的超微结构。

**结果:** 噻吗心安在 0.15625 ~ 5g/L 的浓度范围内均能不同程度地引起 HCE 细胞出现不同程度的生长缓慢、数量减少、胞质皱缩、胞内空泡化、变圆脱落、质膜通透性增大、染色质凝缩、DNA 断片化和出现凋亡小体等典型的细胞凋亡特征, 并具有浓度和时间依赖性。临床使用浓度 2.5 ~ 5g/L 的噻吗心安对 HCE 细胞的凋亡诱导作用最大, 处理 28h 的凋亡率高达 83.23% ~ 96.71%。

**结论:** 噻吗心安在 0.15625 ~ 5g/L 的浓度范围内能显著诱导 HCE 细胞凋亡, 临床使用浓度时对 HCE 细胞的毒性作用极大, 在眼科临床中应谨慎使用。

**关键词:** 人角膜内皮细胞; 噻吗心安; 细胞凋亡; DNA 断片化; 凋亡小体

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.02

**引用:** 樊廷俊, 随蓓蓓, 王清扬, 等. 噻吗心安对人角膜内皮细胞的影响作用研究. *国际眼科杂志* 2013;13(6):1069-1072

## 0 引言

在发达国家及大多数发展中国家, 青光眼是第二大致盲眼病, 全球青光眼患者目前多达 6700 万例<sup>[1]</sup>。青光眼

是一种基本不可逆的致盲眼病,早期治疗对于防止青光眼导致的失明非常重要<sup>[2]</sup>。在青光眼治疗药物中,噻吗心安(timolol maleate,马来酸噻吗洛尔)为 $\beta$ -肾上腺素受体阻滞剂,可以减少房水的生成,有明显的降眼压作用,广泛用于临床治疗青光眼、高血压病、心绞痛及心动过速<sup>[3]</sup>,在眼睑毛细血管瘤的治疗中也具有一定疗效<sup>[4]</sup>。近年来的研究报道显示,噻吗洛尔具有多种不良反应,如可能会引起哮喘<sup>[5]</sup>、重症肌无力<sup>[6]</sup>、阿-斯综合征<sup>[7]</sup>、心动过缓<sup>[8]</sup>、过敏反应<sup>[9]</sup>以及结膜组织炎性反应<sup>[10]</sup>等,研究其毒副作用已刻不容缓。目前,虽已发现毛果芸香碱对家兔角膜内皮细胞具有凋亡诱导作用<sup>[11]</sup>,但有关噻吗心安对人角膜内皮(HCE)细胞凋亡的影响作用至今仍未见报道。非转染HCE组织细胞系的建立使体外研究噻吗心安等眼科药物对HCE细胞的影响作用成为可能<sup>[12,13]</sup>,本文拟以非转染HCE细胞系(utHCEC01)<sup>[12]</sup>为体外实验体系,研究不同浓度噻吗心安对HCE细胞的影响作用,旨在查清噻吗心安对HCE细胞的毒性作用,为临床上青光眼病治疗用药提供理论依据和使用剂量指导。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 将本实验室自行建立的107代非转染人角膜内皮细胞系(utHCEC01)<sup>[12]</sup>,用含有100mL/L胎牛血清(FBS)的DMEM/F12培养液进行体外培养;DMEM/F12(1:1)培养液干粉和胰蛋白酶为Gibco公司产品;胎牛血清为Hyclone公司产品;噻吗心安为苏州亚科化学试剂有限公司产品;细胞/组织DNA快速抽提试剂盒为广州东盛生物科技有限公司产品。

**1.2 方法** 将悬浮于10% FBS-DMEM/F12培养液中的HCE细胞接种至24孔培养板,置37℃,50mL/L CO<sub>2</sub>培养箱培养,待细胞增殖至孔底面积80%后,分别加入含有终浓度0.15625~5g/L噻吗心安的10% FBS-DMEM/F12培养液,在上述相同培养条件下继续培养,跟踪观察各孔中细胞的生长、增殖和形态学变化并照相。按上述方法接种培养HCE细胞和加药后,在相同培养条件继续培养,于不同时间采用2.5g/L胰酶消化和机械吹打法<sup>[13]</sup>分别收获细胞,收集每组3个孔的细胞悬液,混合后1500r/min离心10min,用0.1mL无血清DMEM/F12培养液充分悬浮细胞沉淀,加入4 $\mu$ L吡啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染液(100mg/L AO溶液:100mg/L EB溶液=1:1)充分混匀,室温下染色1min后滴于载玻片上,加盖玻片后置荧光显微镜下观察和照相;细胞核呈红色和橙红色荧光者计为凋亡细胞,而呈亮绿色荧光者计为非凋亡细胞,每组样品随机选择至少4个视野进行细胞计数(不少于300个细胞),按“细胞凋亡率=凋亡细胞数/(正常细胞数+凋亡细胞数) $\times$ 100%”公式计算细胞凋亡率。按上述方法接种培养HCE细胞和加药后,在相同培养条件下继续培养,于不同时间采用上述方法收集细胞沉淀,按照DNA提取试剂盒说明书提取细胞DNA,用1%琼脂糖凝胶对DNA样品进行电泳(4h,15min),将电泳凝胶置0.5mg/L EB中染色10min,置紫外检测仪下观察并照相。将悬浮于上述相同培养液中的HCE细胞接种至25cm<sup>2</sup>培养瓶中置37℃培养箱中培养,待细胞增殖至瓶底面积80%时,加入含有1.25g/L噻吗心安的上述相同培养液,37℃培养8h后用细胞刮刀刮下瓶底细胞,用40g/L戊二醛-蔗糖添加二甲胍缓冲液进行固定,按常规方法进行再固定、包埋、超薄切片和染色处理,置H-700透射电镜下观察并照相。上述实验均以不

加噻吗心安的培养孔或培养瓶中的HCE细胞作为空白对照,每个浓度设3个平行样。

统计学分析:采用SPSS 17.0软件对数据进行统计学分析,以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有检验均采用双侧 $t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HCE细胞的光镜观察** 倒置显微镜观察结果显示,0.625~5g/L噻吗心安处理组的HCE细胞,出现了不同程度的细胞生长缓慢、数量减少、皱缩、胞内空泡化、变圆脱落、最终死亡等现象,并具有明显的浓度和时间依赖性。其中,5g/L噻吗心安对HCE细胞的毒性作用最大,处理8h后绝大部分细胞死亡,与空白对照组差异极为显著(图1A,F);1.25~2.5g/L噻吗心安对HCE细胞的毒性作用次之,处理8h后绝大部分细胞出现高度空泡化(图1B,C),28h后绝大部分或大部分细胞死亡(图1G,H);0.625g/L噻吗心安对HCE细胞的毒性作用较弱,处理8h后大部分细胞出现高度空泡化(图1D),28h后仅有少部分细胞死亡(图1I);而0.078125~0.3125g/L噻吗心安对HCE细胞的影响作用与空白对照组没有显著差异(图1E,F,J~L)。上述观察结果表明,0.625~5g/L噻吗心安对HCE细胞具有显著的毒性作用,且具有浓度和时间依赖性。

**2.2 AO/EB荧光双染色结果** 荧光显微镜观察和统计结果显示,噻吗心安在0.15625~5g/L的浓度范围内均可引起HCE细胞质膜通透性发生不同程度的提高(图2)。其中,1.25~5g/L噻吗心安对HCE细胞质膜通透性的增强作用极强,处理28h的凋亡率分别高达96.71%、83.23%和45.52%,与空白对照组相比具有显著差异( $P < 0.01$ ),且具有浓度和时间依赖性;而0.15625~0.625g/L噻吗心安对HCE细胞质膜通透性的增强作用较弱,但除20h外与空白对照组相比也具有显著差异( $P < 0.01$ )和统计学差异( $P < 0.05$ )。上述结果显示,0.15625~5g/L噻吗心安均可不同程度地诱导HCE细胞凋亡,并具有浓度和时间依赖性。

**2.3 HCE细胞DNA的琼脂糖凝胶电泳结果** 10g/L琼脂糖凝胶电泳结果显示,5g/L噻吗心安处理8h后HCE细胞的DNA绝大部分被降解成短片段而位于凝胶前端(图3A),0.625~2.5g/L噻吗心安处理16~20h后HCE细胞的DNA均出现了典型的梯状条带(图3B~D),而0.15625~0.3125g/L噻吗心安处理28h后HCE细胞的DNA虽未出现典型梯状条带,但与空白对照组相比在凝胶前端也出现了少量DNA降解物(图3E~G)。DNA琼脂糖凝胶电泳结果表明,噻吗心安在0.15625~5g/L的浓度范围内能诱导HCE细胞发生DNA的断片化,具有诱导HCE细胞凋亡的作用。

**2.4 HCE细胞的透射电镜观察结果** 处于不同凋亡时期的HCE细胞的TEM观察结果见图4。与未加药空白对照组HCE细胞的形态和结构(图4A)相比,经0.125g/L噻吗心安处理8h后,有些HCE细胞出现了凋亡早期的形态和结构特征,如胞质中出现许多大的空泡、染色质凝缩并在核内边缘化(图4B);有些HCE细胞出现了凋亡中期的形态和结构特征,如胞质皱缩、超微结构紊乱、核固缩、染色质凝缩进而核内边缘化、细胞开始解体和形成凋亡小体(图4C);有些HCE细胞出现了凋亡后期的形态和结构特征,

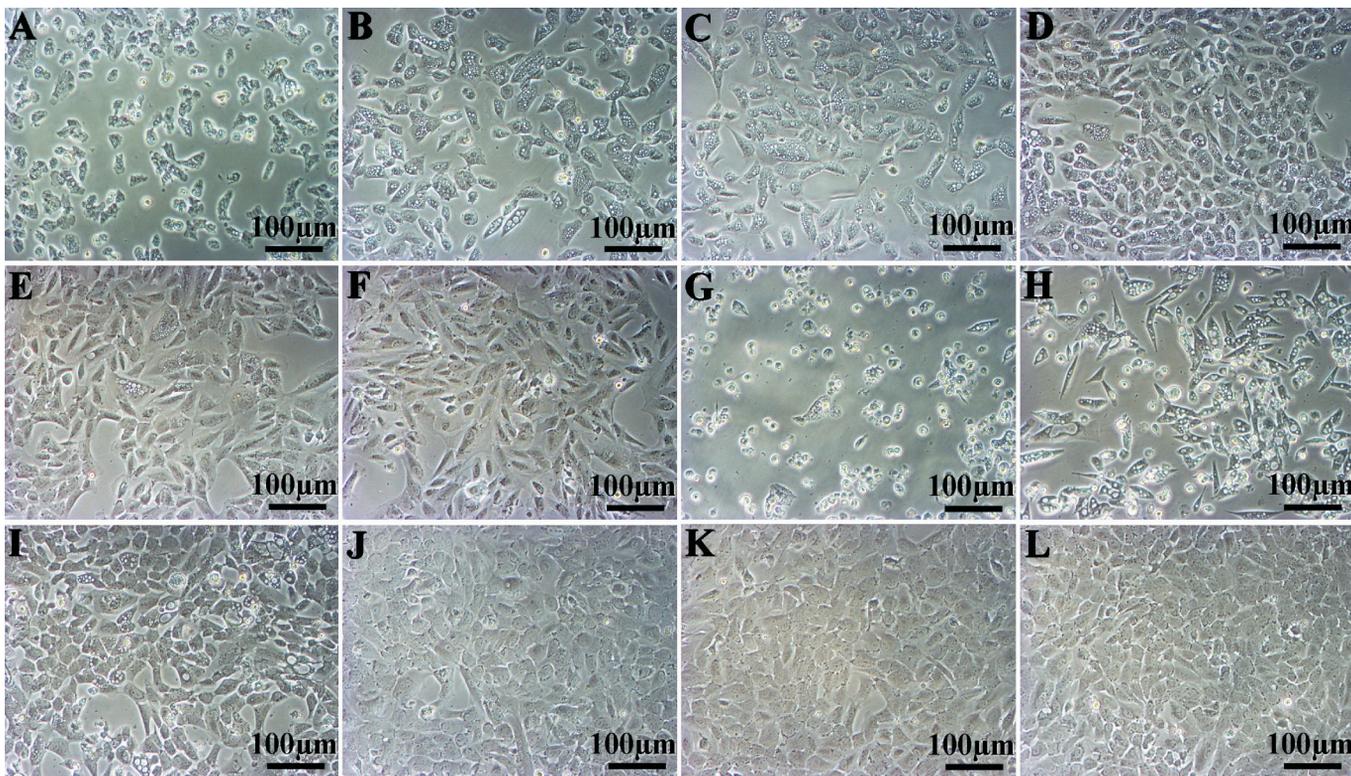


图1 噻吗心安处理 HCE 细胞的光镜观察 A:5g/L,8h;B:2.5g/L,8h;C:1.25g/L,8h;D:0.625g/L,8h;E:0.3125g/L,8h;F:空白对照,8h;G:2.5g/L,28h;H:1.25g/L,28h;I:0.625g/L,28h;J:0.15625g/L,28h;K:0.078125g/L,28h;L:空白对照,28h。

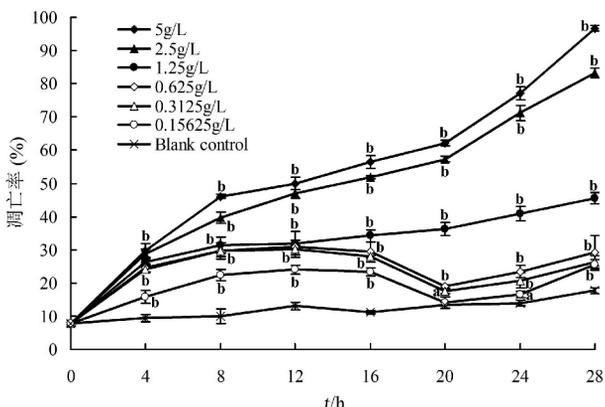


图2 噻吗心安处理 HCE 细胞的凋亡率 <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组。

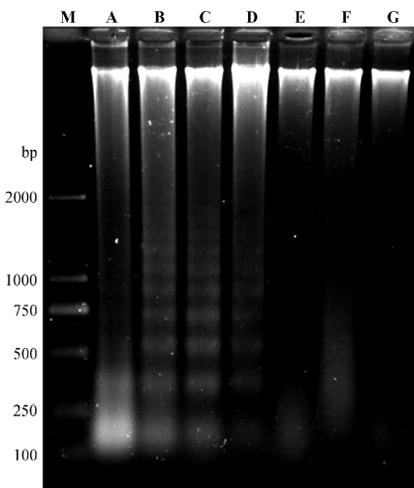


图3 噻吗心安处理 HCE 细胞的 DNA 电泳图谱 M: D2000 DNA marker; A: 5g/L, 8h; B: 2.5g/L, 16h; C: 1.25g/L, 20h; D: 0.625g/L, 20h; E: 0.3125g/L, 28h; F: 0.15625g/L, 28h; G: 空白对照, 28h。

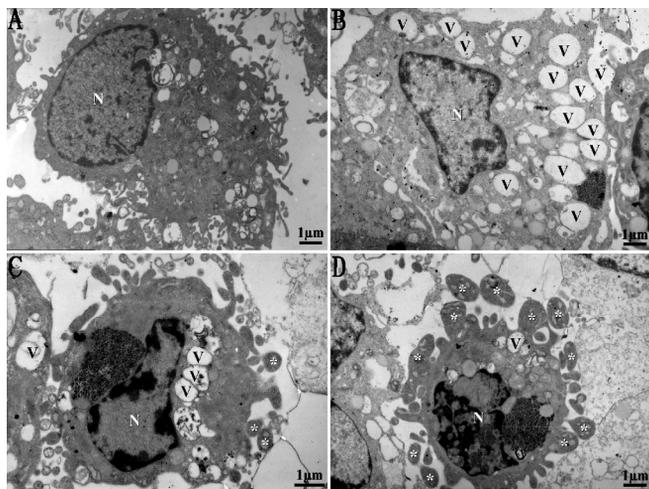


图4 噻吗心安处理 HCE 细胞 8h 的透射电镜照片 A: 空白对照; B~D: 0.125g/L. V: 空泡; N: 细胞核; \*: 凋亡小体。

到 8h 时核被膜破裂、细胞周围出现大量凋亡小体(图 4D)。这些结果表明,噻吗心安处理后确能引起 HCE 细胞出现细胞凋亡的典型形态和结构特征,证实一定浓度的噻吗心安确能诱导 HCE 细胞发生凋亡。

### 3 讨论

由单层 HCE 细胞构成的角膜内皮层在维持角膜的透明度、厚度及生理功能中具有关键作用<sup>[14]</sup>。成人 HCE 细胞丧失了增殖能力,局部 HCE 细胞的死亡只能临近细胞的扩大和移行来修补成单层,故随着年龄的增长其细胞密度逐渐降低,致使角膜透明度逐年下降<sup>[15]</sup>。如果 HCE 细胞受到各种理化因素如药物和高眼压等的损伤,将会引起 HCE 细胞的死亡速率加快,导致角膜透明度降低,严重者将影响视力<sup>[16]</sup>。因此,研究药物尤其是眼科药物对 HCE 细胞的影响作用,对于眼科临床的安全用药将具有重要的

理论价值。

噻吗心安是眼科临床上治疗青光眼的常用降压药物,其临床使用浓度一般为2.5~5g/L。为了检测噻吗心安对HCE细胞的毒性作用,我们以临床使用浓度5g/L为基础对噻吗心安进行了倍比稀释,并利用本实验室已有的非转染HCE细胞系首次研究了不同浓度噻吗心安处理不同时间对HCE细胞的影响作用。光镜观察结果显示,0.625~5g/L噻吗心安对HCE细胞具有显著的毒性作用,能引起细胞生长缓慢、数量减少、皱缩、胞内空泡化、变圆脱落甚至死亡,并具有浓度和时间依赖性,临床使用浓度的毒性作用最大。这些形态上的变化与细胞凋亡过程中的形态变化十分相似<sup>[17]</sup>,暗示噻吗心安可能具有诱导HCE细胞凋亡的作用。为了验证这一点,我们又利用AO/EB荧光双染色对不同浓度噻吗心安处理不同时间的HCE细胞进行了质膜通透性的检测,因为质膜通透性的提高是凋亡细胞生理学变化的显著特征之一<sup>[18]</sup>。AO/EB双染色结果发现,0.15625~5g/L噻吗心安均可不同程度地提高质膜通透性,即很有可能是诱导了HCE细胞凋亡,也具有浓度和时间依赖性,与光镜下的观察结果相是一致的;而0.15625~0.625g/L处理20h时HCE细胞凋亡率的降低,可能与此时许多细胞形成了凋亡小体、常规离心无法收集从而致使凋亡细胞数量减少有关。

DNA断片化是细胞凋亡的标志性特征之一<sup>[19]</sup>。为了证实噻吗心安对HCE细胞的凋亡诱导作用,我们又利用琼脂糖凝胶电泳对不同浓度噻吗心安处理不同时间HCE细胞的DNA进行了检测,发现0.15625~5g/L噻吗心安能引起HCE细胞发生DNA断片化,证明噻吗心安确具有诱导HCE细胞凋亡的作用。在细胞凋亡过程中,核染色质DNA断裂为大小不等的片断后,便与某些细胞器如线粒体一起聚集,进而为质膜所包围,从细胞表面产生了许多泡状或芽泡状突起,逐渐分隔后便形成了一个的凋亡小体,最终被邻近具有吞噬能力的细胞所吞噬和清除<sup>[20]</sup>。为了进一步证实噻吗心安对HCE细胞的凋亡诱导作用,我们还对0.125g/L噻吗心安处理8h后HCE细胞的超微结构进行了透射电镜观察,发现噻吗心安处理HCE细胞出现了胞质皱缩、超微结构紊乱、核固缩、染色质凝聚且核内边缘化以及出现凋亡小体等凋亡细胞的典型形态学变化,与已报道凋亡细胞的形态学特征是一致的<sup>[13,21]</sup>。进一步证实噻吗心安确能诱导HCE细胞发生细胞凋亡。

综上所述,噻吗心安在0.15625~5g/L的浓度范围内均能诱导体外培养HCE细胞发生凋亡,并具有浓度和时间依赖性,故2.5~5g/L临床使用浓度的噻吗心安对HCE细胞具有极为强烈的毒性作用,在浓度低于1.25g/L时毒

性作用相对较弱,暗示在眼科临床使用噻吗心安这种抗青光眼药物时应选择较低的使用浓度、切忌长期连续用药,而开发出新型、无毒的噻吗心安替代品将是从根本上解决噻吗心安毒副作用的有效途径。

#### 参考文献

- 1 Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* 1996;80(5):389-393
- 2 宋爽,陈晓明,林楠. 青光眼住院病人流行病学调查—疾病构成及其变化特点. *中国实用眼科杂志* 2003;21(12):932-936
- 3 陈新谦,金有豫,汤光. 新编药理学. 北京:人民卫生出版社 2007:314
- 4 Guo S, Ni N. Topical treatment for capillary hemangioma of the eyelid using b-blocker solution. *Arch Ophthalmol* 2010;128(2):255-256
- 5 杨金彪. 噻吗洛尔滴眼液致哮喘1例. *现代中西医结合杂志* 2007;16(24):3516
- 6 王时力,张亚琴. 噻吗心安眼液致重症肌无力1例. *眼科新进展* 1999;19(4):273
- 7 沈国伟,冯燕娴. 噻吗心安滴眼液致频发阿-斯综合征一例. *中华眼科杂志* 1998;34(3):182
- 8 刘惠娟,吴涓虹,解卉云. 噻吗洛尔点眼致严重不良反应. *临床误诊误治* 2000;13(6):474
- 9 姜映滨,黄怀荣. 噻吗心安点眼致过敏反应1例报告. *中国现代医学杂志* 1995;5(2):77
- 10 彭坤,许银霞,王保君,等. 长期联合应用噻吗洛尔对结膜组织炎症性反应的影响. *国际眼科杂志* 2011;11(12):2099-2101
- 11 陶远,王红,乔智. 毛果芸香碱滴眼对兔眼角膜内皮细胞凋亡作用的影响. *山东大学学报* 2007;45(12):1271-1274
- 12 Fan T, Zhao J, Ma XY, et al. Establishment of a continuous untransfected human corneal endothelial cell line and its biocompatibility to denuded amniotic membrane. *Mol Vis* 2011;17:469-480
- 13 樊廷俊,温茜,于苗苗,等. 盐酸奥布卡因对人角膜内皮细胞影响作用的实验研究. *国际眼科杂志* 2012;12(8):1442-1446
- 14 Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res* 2010;91(3):326-335
- 15 Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 2003;22:359-389
- 16 Schierhölter R, Honegger H. Morphology of the corneal endothelium under normal conditions and during regeneration after mechanical injury. *Adv Ophthalmol* 1975;31:34-99
- 17 Vaux DL. Apoptosis timeline. *Cell Death Differ* 2002;9(4):349-354
- 18 袁小鹏,焦伟华,徐如祥. 肿瘤细胞AO、EB荧光染色法在药敏试验中的可行性探讨. *癌症* 1999;18(3):359-360
- 19 牛建昭,魏育林,曹炜. 细胞坏死和凋亡(Apoptosis)DNA状态的比较. *解剖学报* 1995;2:142-145
- 20 吕桂芝,胡颖,张志谦,等. 三磷酸腺苷诱导人白血病细胞U937凋亡的电镜观察. *解剖学报* 2000;31(1):48-51
- 21 韩贻仁. 分子细胞生物学. 第3版. 北京:高等教育出版社 2007:469-471