

· 实验研究 ·

苦参碱对体外人 Tenon 囊成纤维细胞的增生抑制及凋亡促进作用

嵇芳芳 帅捷 梁亚 俞秋丽 孙贞燕 袁志兰

南京医科大学第一附属医院眼科 210029

通信作者:袁志兰, Email:zhilanyuan@vip. sina. com

【摘要】 目的 研究苦参碱对体外培养人 Tenon 囊成纤维细胞 (HTFs) 增生和凋亡过程的影响。 **方法** 复苏冻存的 HTFs 后进行培养、传代,取第 3~4 代细胞进行实验。用终质量浓度梯度为 0、0.3、0.6、0.9 g/L 苦参碱作用于体外培养的 HTFs 24~72 h,采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测 HTFs 增生情况;采用流式细胞术检测 HTFs 的凋亡情况;采用 Western blot 法、实时荧光定量 PCR 法检测凋亡相关转录因子 caspase-3 的表达情况。 **结果** 在梯度质量浓度苦参碱的作用下,HTFs 的增生被抑制,且随着时间的延长和质量浓度的增加,抑制效果更明显,差异均有统计学意义 ($F_{\text{浓度}} = 1\,019.51, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 5\,848.66, P = 0.00; F_{\text{交互作用}} = 147.45, P = 0.00$)。0.3、0.6 和 0.9 g/L 苦参碱作用后,HTFs 的早期凋亡率分别为 $(2.68 \pm 0.30)\%$ 、 $(5.08 \pm 0.47)\%$ 、 $(6.97 \pm 0.69)\%$ 和 $(10.30 \pm 1.20)\%$, caspase-3 蛋白表达的灰度值分别为 1.00 ± 0.13 、 1.90 ± 0.19 、 2.50 ± 0.30 和 2.67 ± 0.30 , caspase-3 mRNA 的相对表达量分别为 0.98 ± 0.12 、 2.01 ± 0.34 、 6.15 ± 0.60 和 11.40 ± 1.12 , 总体比较差异均有统计学意义 ($F = 55.74, 66.01, 154.50$, 均 $P < 0.01$), 随着苦参碱质量浓度的升高, HTFs 的早期凋亡率明显升高, caspase-3 蛋白、caspase-3 mRNA 的相对表达量明显升高, 各质量浓度组间两两比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。 **结论** 苦参碱可抑制体外培养 HTFs 的增生, 并呈剂量及时间依赖性; 苦参碱可促进 HTFs 凋亡。

【关键词】 苦参碱; 人 Tenon 囊成纤维细胞; 增生; 凋亡**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81271001)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.05.003

Effects of matrine on human Tenon capsule fibroblast *in vitro*

Ji Fangfang, Shuai Jie, Liang Ya, Yu Qiuli, Sun Zhenyan, Yuan Zhilan

Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Yuan Zhilan, Email:zhilanyuan@vip. sina. com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of matrine on proliferation and apoptosis of human Tenon capsule fibroblasts (HTFs) *in vitro*. **Methods** After treated with 0, 0.3, 0.6 and 0.9 g/L matrine *in vitro*, cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to assay the proliferation of HTFs at 24, 48 and 72 hours, Western blot and PCR were performed to evaluate the expression of apoptosis-associated factor caspase-3 on both protein and RNA levels. **Results** The activity of human Tenon capsule fibroblast at 48 hours and 72 hours after treated with 0.3, 0.6, 0.9 g/L matrine was significantly inhibited when compared with the 0 g/L matrine group, and the inhibitory effect was dose-dependent and time-dependent ($F_{\text{concentration}} = 1\,019.51, P = 0.00; F_{\text{time}} = 5\,848.66, P = 0.00; F_{\text{interaction}} = 147.45, P = 0.00$). After treated with 0, 0.3, 0.6 and 0.9 g/L matrine, the early apoptosis rate of HTFs was $(2.68 \pm 0.30)\%$, $(5.08 \pm 0.47)\%$, $(6.97 \pm 0.69)\%$ and $(10.30 \pm 1.20)\%$, the grey value of caspase-3 protein was 1.00 ± 0.13 , 1.90 ± 0.19 , 2.50 ± 0.30 and 2.67 ± 0.30 , the relative expression of caspase-3 mRNA was 0.98 ± 0.12 , 2.01 ± 0.34 , 6.15 ± 0.60 and 11.40 ± 1.12 , respectively, with significant differences among them ($F = 55.74, 66.01, 154.50$; all at $P < 0.01$), the early apoptosis rate of HTFs, the grey value of caspase-3 protein and the relative expression of caspase-3 mRNA were all increased significantly as the concentration of matrine increased, with significant differences between any two groups (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Matrine can inhibit the proliferation of HTFs and induce the apoptosis of HTFs in a time- and dose-dependent manner.

【Key words】 Matrine; Human Tenon capsule fibroblast; Proliferation; Apoptosis**Fund program:** The General Program of Natural Science Foundation of China (81271001)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.05.003

人 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon capsule fibroblasts, HTFs) 为存在于结膜下结缔组织的未分化间叶细胞^[1]。青光眼滤过性手术后滤过道的瘢痕化是手术失败的主要原因,其主要特征之一是 HTFs 转化为肌成纤维细胞持续存在并产生大量的细胞外基质^[2-3]。目前,术中应用抗增生药物,如丝裂霉素可以提高手术成功率,但由于其具有一定的毒性作用和不良反应,临床中对其使用有所限制。寻找既能有效防止滤过手术失败,又能有效抑制成纤维细胞增生的方法仍是青光眼研究的重点^[4]。苦参碱作为豆科植物苦参的主要有效成分,对其他组织及器官纤维细胞的增生、胶原等成分的合成等具有明显抑制作用^[5],但其对 HTFs 的影响少有研究。本研究探讨苦参碱对 HTFs 增生、凋亡过程的影响,以期对青光眼滤过性手术的术中用药提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 南京医科大学第一附属医院眼科实验室液氮罐内冻存的细胞,已验证为 HTFs^[6-8]。

1.1.2 主要试剂及仪器 苦参碱(西安陕西亿康龙生物技术有限公司);DMEM 培养液、胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(TA309157)、一抗稀释液(北京中杉金桥生物技术有限公司);兔抗人 caspase-3 抗体(ab13847,英国 Abcam 公司);BSA 封闭液(武汉博士德生物工程有限公司);青霉素、链霉素(美国 Amersco 公司)。Western blot 蛋白电泳及转膜系统、凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);流式细胞仪(美国 Beckman 公司);PCR 逆转录仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HTFs 细胞复苏及传代 将保存在液氮中装有 HTFs 的冻存管迅速投入 37℃ 恒温水浴锅,轻轻摇动,尽量使冻存的细胞在 1 min 内融化;取出冻存管,体积分数 95% 乙醇消毒外壁后,于超净工作台内开启管口,用吸管将细胞悬液转移至 15 ml 离心管中,并在离心管内加入等量 DMEM 培养液,轻吹混匀,离心半径 13.5 cm,800 r/min 离心 5 min,弃上清;DMEM 培养液洗涤 1 次,同等条件再次离心,弃上清。加入 5 ml DMEM 完全培养液,轻吹混匀,接种于培养皿中,置于 37℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件的培养箱中培养。次日更换 1 次培养液,在培养液由淡红色变为黄

色后更换培养液,待细胞爬满瓶底的 80% 时进行传代。取第 3 代细胞进行实验。

1.2.2 细胞计数试剂盒 8 法测定 HTFs 细胞增生情况 将传代细胞以 5×10^3 /孔密度接种于 96 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后,加入终质量浓度梯度为 0、0.3、0.6 和 0.9 g/L 苦参碱,并于 0、24、48 和 72 h 分别向每孔加入 10 μ l 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK8) 试剂,继续培养 2 h。采用酶联免疫检测仪测定波长 450 nm 处吸光度(A)值,每组设 3 个复孔,取平均值。

1.2.3 流式细胞术检测 HTFs 细胞凋亡 将 HTFs 于 6 孔板中培养 24 h,待其贴壁后,将不加药(对照组)和加入终质量浓度为 0.3、0.6 和 0.9 g/L 苦参碱(实验组)处理的 HTFs 分别继续培养 24 h,采用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化并收集细胞,离心半径 13.5 cm,1 000 r/min 离心 5 min,吸去上层培养基后,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。以 500 μ l 结合缓冲液重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μ l。轻轻混匀细胞,于室温下避光孵育 15 min。流式细胞术检测细胞凋亡情况,记录早期凋亡细胞的百分数。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.4 Western blot 法测定细胞中 caspase-3 蛋白表达 将 HTFs 于 6 孔板中培养 24 h,待其贴壁后,将终质量浓度为 0.3、0.6、0.9 g/L 苦参碱(实验组)处理的 HTFs 分别继续培养 24 h,采用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化并收集细胞,离心半径 13.5 cm,1 000 r/min 离心 5 min,吸去上层培养基后用预冷的 PBS 洗涤细胞,并重复 2 次。在每孔中加入 100 μ l 细胞裂解液,摇匀,将 6 孔板放于冰上作用 30 min,收集细胞,置于 EP 管中,4℃ 条件下,离心半径 5.5 cm,13 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。用 BCA 法测定各组总蛋白的质量浓度,按最低质量浓度组的数值调节到一致。蛋白样本在质量分数 5% 和 10% SDS-PAGE 凝胶电泳(条件:浓缩胶 80 V;分离胶 120 V)中作用 2 h,利用蛋白印迹转膜仪在 300 mA 恒流条件下作用 100 min,将蛋白样本转印至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜上,然后置于质量分数 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h,在一抗(鼠抗人 GAPDH 抗体、兔抗人 caspase-3 抗体)(1:500)工作液中 4℃ 孵育过夜。以 TBST 洗涤 NC 膜 3 次,室温下把 NC 膜浸泡在二抗(鼠抗人 GAPDH 抗体、兔抗人 caspase-3 抗体)(1:5 000)工作液中孵育 1 h,孵育完成后用 TBST 洗涤 3 次,ECL 化学发光试剂盒进行显影,于 X 感光片感光后显影定影。采用 Image J 软件分析测量显影后蛋白条带的灰度值,以 GAPDH 为内参,计算各目的蛋白相对表达量。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 caspase-3 mRNA 表达 将 HTFs 于 6 孔板中培养 24 h, 待其贴壁后, 将不加药(对照组)和加入终质量浓度为 0.3、0.6 和 0.9 g/L 苦参碱(实验组)处理的 HTFs 分别继续培养 24 h, 采用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化并收集细胞, 离心半径 13.5 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸去上层培养基后用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。按 Trizol 法提取 HTFs 总 RNA, 用分光光度仪测定 RNA 的浓度和纯度, 将浓度和纯度好的 RNA 进行 -80°C 保存。按照逆转录试剂盒说明书操作, 取总 RNA 2 μg 与说明书推荐用量的 Mix 和 DEPC 水混匀后, 加入 ABI 7300 PCR 逆转录仪, PCR 反应条件: 37°C 反应 15 min, 85°C 反应 5 s, 4°C 循环, 得到 cDNA, -20°C 保存备用。逆转录后的 cDNA 加入引物和 Mix, 吹打混匀后, 加入上样板, 每个基因每个样本均设置 3 个复孔, 4°C 条件下, $12\ 000\times g$ 离心 2 min, 于 ABI 7300 实时定量 PCR 仪上按照说明书推荐参数进行 PCR 扩增。caspase-3 上游引物为 5'-TGGAACAAATGGACCTGTTGACC-3', 下游引物 5'-AGGACTCAAATTCTGTTGCCACC-3'; GAPDH 上游引物为 5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3', 下游引物为 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3'。反应条件: 94°C 变性 1 min, 55°C 复性 45 s, 75°C 延伸 1 min,

共 35 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因的相对表达量。实验重复 3 次, 取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。计量资料的数据经 W 检验证实呈正态分布, 以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 经 Levene 方差齐性检验证实方差齐, 不同质量浓度苦参碱素作用后不同时间点 HTFs 细胞增生抑制率的比较采用析因设计的两因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验; 不同质量浓度苦参碱作用后各组细胞早期凋亡率、caspase-3 mRNA 和蛋白相对表达水平的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同质量浓度苦参碱作用后各组细胞增生情况比较

0、0.3、0.6 和 0.9 g/L 苦参碱作用于体外培养的 HTFs 后 24~72 h, 结果显示在梯度质量浓度苦参碱的作用下, HTFs 的增生被抑制, 且随着作用时间的延长和质量浓度的增加, 抑制效果更明显, 不同质量浓度苦参碱作用后不同时间点 HTFs 细胞 A 值比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{浓度}} = 1\ 019.51, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 5\ 848.66, P = 0.00; F_{\text{交互作用}} = 147.45, P = 0.00$) (表 1)。

2.2 不同质量浓度苦参碱作用后各组细胞凋亡情况比较

0、0.3、0.6 和 0.9 g/L 苦参碱作用于体外培养的 HTFs 后 48 h, 各组细胞早期凋亡率分别为 $(2.68 \pm 0.30)\%$ 、 $(5.08 \pm 0.47)\%$ 、 $(6.97 \pm 0.69)\%$ 和 $(10.30 \pm 1.20)\%$, 随着苦参碱质量浓度的升高, 细胞早期凋亡率逐渐升高, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 55.74, P < 0.01$), 各质量浓度组间两两比较, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 1)。

2.3 不同浓度苦参碱作用后 caspase-3 蛋白相对表达水平比较

0、0.3、0.6 和 0.9 g/L 苦参碱作用于体外培养的 HTFs 后 48 h, caspase-3 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 、 1.90 ± 0.19 、 2.50 ± 0.30 和 2.67 ± 0.30 , 随着苦参碱质量浓度的升高, caspase-3 蛋白相对表达水平逐渐升高, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 66.01, P <$

表 1 不同质量浓度苦参碱作用后不同时间点 HTFs 细胞 A 值比较 (mean $\pm$ SD)

苦参碱 质量浓度 (g/L)	样本量	不同时间点 HTFs 细胞 A 值			
		0 h	24 h	48 h	72 h
0	3	0.504 $\pm$ 0.002	0.530 $\pm$ 0.008	0.869 $\pm$ 0.002	1.462 $\pm$ 0.014
0.3	3	0.497 $\pm$ 0.003	0.527 $\pm$ 0.011	0.808 $\pm$ 0.030 ^a	1.320 $\pm$ 0.007 ^a
0.6	3	0.501 $\pm$ 0.003	0.513 $\pm$ 0.004	0.762 $\pm$ 0.022 ^a	1.172 $\pm$ 0.004 ^a
0.9	3	0.504 $\pm$ 0.002	0.506 $\pm$ 0.006 ^a	0.665 $\pm$ 0.002 ^a	0.924 $\pm$ 0.010 ^a

注: $F_{\text{质量浓度}} = 1\ 019.51, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 5\ 848.66, P = 0.00; F_{\text{交互作用}} = 147.45, P = 0.00$ 。与同时时间点 0 g/L 苦参碱组比较, ^a $P < 0.05$ (析因设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) HTFs: 人 Tenon 囊成纤维细胞

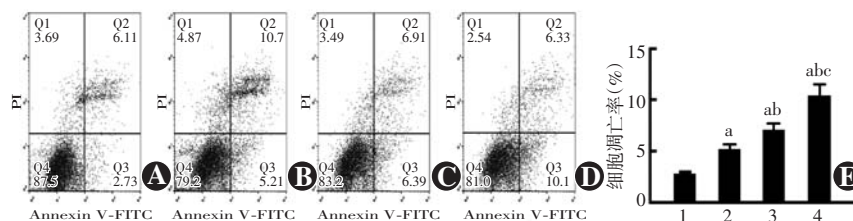


图 1 0、0.3、0.6 和 0.9 g/L 苦参碱作用于体外培养的 HTFs 后 48 h 细胞早期凋亡率比较 随着苦参碱质量浓度的升高, 细胞早期凋亡率逐渐升高 A: 0 g/L 苦参碱组流式细胞图 B: 0.3 g/L 苦参碱组流式细胞图 C: 0.6 g/L 苦参碱组流式细胞图 D: 0.9 g/L 苦参碱组流式细胞图 E: 各组 HTFs 细胞早期凋亡率的量化比较 与 0 g/L 苦参碱组比较, ^a $P < 0.05$; 与 0.3 g/L 苦参碱组比较, ^b $P < 0.05$; 与 0.6 g/L 苦参碱组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) 1: 0 g/L 苦参碱组 2: 0.3 g/L 苦参碱组 3: 0.6 g/L 苦参碱组 4: 0.9 g/L 苦参碱组

0.01),各质量浓度组间两两比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图2)。

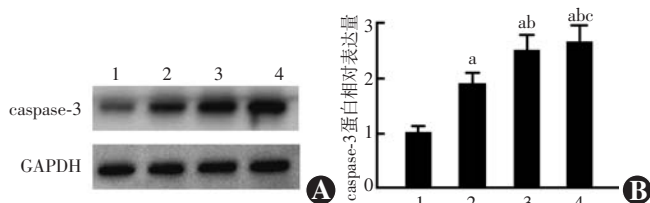


图2 0、0.3、0.6和0.9 g/L苦参碱作用于体外培养的HTFs后48 h caspase-3蛋白表达量比较 A:Western blot法检测结果显示,随着苦参碱质量浓度的升高,caspase-3蛋白相对表达水平逐渐升高 B:各组caspase-3蛋白相对表达水平的量化比较 与0 g/L苦参碱组比较,^a $P < 0.05$;与0.3 g/L苦参碱组比较,^b $P < 0.05$;与0.6 g/L苦参碱组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验, $n=3$) 1:0 g/L苦参碱组 2:0.3 g/L苦参碱组 3:0.6 g/L苦参碱组 4:0.9 g/L苦参碱组 注:GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

2.4 不同浓度苦参碱作用后 caspase-3 mRNA 的相对表达量比较

0、0.3、0.6和0.9 g/L苦参碱作用于体外培养的HTFs后48 h,caspase-3 mRNA的相对表达水平分别为 0.98 ± 0.12 、 2.01 ± 0.34 、 6.15 ± 0.60 和 11.40 ± 1.12 ,随着苦参碱质量浓度的增加,caspase-3 mRNA相对表达水平逐渐升高,总体比较差异有统计学意义($F = 154.50, P < 0.01$),各质量浓度组间两两比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图3)。

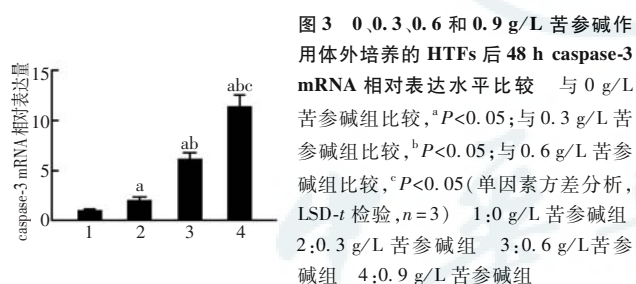


图3 0、0.3、0.6和0.9 g/L苦参碱作用体外培养的HTFs后48 h caspase-3 mRNA相对表达水平比较 与0 g/L苦参碱组比较,^a $P < 0.05$;与0.3 g/L苦参碱组比较,^b $P < 0.05$;与0.6 g/L苦参碱组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验, $n=3$) 1:0 g/L苦参碱组 2:0.3 g/L苦参碱组 3:0.6 g/L苦参碱组 4:0.9 g/L苦参碱组

3 讨论

青光眼是一种世界范围内的主要致盲眼病,目前其主要治疗手段仍是滤过性手术,滤过道瘢痕化形成使滤过道堵塞是滤过性手术失败的主要原因^[9-10]。其发生过程为人Tenon囊下间隙在手术操作的刺激下,HTFs发生增生、移行、释放胶原蛋白并引起纤维血管反应和手术创口挛缩,从而导致瘢痕形成^[11]。临床上,常在术中用抗代谢药物,如5-氟尿嘧啶和丝裂霉素C来防止术后瘢痕形成,但仍存在结膜泡漏、低眼压、巩膜溶解、眼内炎等并发症^[12],因此探索新的抗瘢痕药物仍十分重要。现在很多研究者也将探寻治疗瘢

痕药物的目光转移到传统中草药上。

苦参碱(分子式 $C_{15}H_{24}N_2O$)是豆科植物苦参的主要有效成分,研究发现其除了具有抗心律失常、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等作用外^[13-16],还对多种细菌有明显的抑制作用,这一特性增强了其眼内使用的安全性^[17]。大量研究表明,苦参碱对多种纤维细胞的增生、胶原的合成等具有明显抑制作用^[18-19],且在临床上治疗慢性肝炎和肝纤维化等疾病中应用广泛^[20]。Zhang等^[21]研究发现,苦参碱可以通过降低纤维化细胞因子的表达而抑制其纤维化的过程,也可减少胶原活动度,从而预防肝脏的纤维化;付平等^[22]发现,苦参碱可通过上调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的表达,达到延迟肾小球、肾间质纤维化的目的。在眼科疾病的防治中,苦参碱仍多处于实验阶段。刘丽娅等^[23]研究发现,苦参碱可以抑制白细胞介素-1 β 诱导下兔视网膜色素上皮细胞的增生;刘丹岩等^[24]研究发现,苦参碱聚乳酸微球兔眼玻璃体腔注射能够有效防治实验性增生性玻璃体视网膜病变。根据其广泛的药理作用,其在眼科疾病的治疗中可能具有良好的应用前景,但其对HTFs的影响尚少见。

凋亡是由基因控制的细胞主动死亡的过程,能够调控机体发育并维护内环境稳定,细胞凋亡在抗纤维化、防止瘢痕形成中具有重要意义。有研究认为,瘢痕形成的主要机制是以成纤维细胞为主的细胞增生活性增强,不能进入正常凋亡途径,从而合成并分泌大量的细胞外基质在组织中沉积,难以被机体吸收或重塑,形成病理状态^[25]。苦参碱可使成纤维细胞DNA复制及有丝分裂障碍,抑制成纤维细胞增生,使S期的DNA合成减缓,细胞停滞于G₀/G₁期;诱导细胞凋亡,并使细胞群体倍增时间延长,且与药物浓度成正相关,但不使细胞DNA发生变异^[26]。还有研究表明,苦参碱可使细胞周期蛋白E2F-1的表达上调以及诱发细胞色素C释放,激活caspase-3和caspase-9,从而通过线粒体途径诱导K562(慢性粒细胞白血病细胞系中的一种)细胞凋亡^[27]。研究表明,体外苦参碱抗瘢痕的有效作用质量浓度为0.1~1.0 g/L,故本实验组中选取上述有效质量浓度范围内质量浓度梯度为0.3、0.6和0.9 g/L的苦参碱。本研究发现,在梯度质量浓度的苦参碱作用下,HTFs的增生被抑制,且随时间和质量浓度的增加,抑制效果更明显。此外,本研究中流式细胞仪检测发现,梯度质量浓度苦参碱处理过的HTFs,随着药物质量浓度的增高,其凋亡率也随之上升。caspase-3转录因子是凋亡途径的核心蛋白酶,在细胞

凋亡方面具有重要意义^[28]。本实验检测了梯度质量浓度苦参碱作用下, HTFs 中 caspase-3 转录因子在蛋白水平和 RNA 水平上均高表达, 表明苦参碱对 caspase-3 的表达有促进作用, 即苦参碱可促进 HTFs 的凋亡, 且作用随药物质量浓度的增加而增加。

综上所述, 本研究发现苦参碱能抑制 HTFs 增生并促进其凋亡, 为青光眼滤过性手术的术中用药提供新的选择。此外, 关于苦参碱药物浓度的选择、给药途径的选择及药物作用时间长短的选择等对抑制术后滤过泡瘢痕形成效果的影响, 有待今后进一步研究。

参考文献

- [1] Liu S, Wang J, Zou H, et al. Effect of apigenin on gap junctional intercellular communication in human Tenon's capsule fibroblasts [J]. *Eye Sci*, 2013, 28(2): 62-67.
- [2] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199-210.
- [3] Zhang JY, Gao P, Ye W, et al. Functional characteristics of connective tissue growth factor on human tenon's capsule fibroblast [J]. *Curr Eye Res*, 2014, 39(1): 53-61. DOI:10.3109/02713683.2013.833245.
- [4] Gabriel V. Hypertrophic scar [J]. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 2011, 22(2): 301-310. DOI:10.1016/j.pmr.2011.02.002.
- [5] 郑燕林, 刘嘉立, 王禹燕, 等. 苦参碱对体外培养人翼状胬肉成纤维细胞增殖的影响 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2007, 17(2): 85-88. Zheng YL, Liu JL, Wang YY, et al. Effect of matrine on the proliferation of human pterygium fibroblasts [J]. *J Tradit Chin Ophthalmol*, 2007, 17(2): 85-88.
- [6] 范莲, 袁志兰, 陈琴, 等. 羟基喜树碱抑制人眼 Tenon 囊成纤维细胞增殖的实验研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(16): 3067-3070. Fan L, Yuan ZL, Chen Q, et al. Inhibitory effect of 10-hydroxycamptothecin on the cultured human Tenon's capsule fibroblasts [J]. *Prog Modern Biomed*, 2011, 11(16): 3067-3070.
- [7] Yin X, Sun H, Yu D, et al. Hydroxycamptothecin induces apoptosis of human tenon's capsule fibroblasts by activating the PERK signaling pathway [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(7): 4749-4758. DOI:10.1167/iovs.12-11447.
- [8] Xu X, Fu Y, Tong J, et al. MicroRNA-216b/Bcl-1 axis regulates autophagy and apoptosis in human Tenon's capsule fibroblasts upon hydroxycamptothecin exposure [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 123: 43-55. DOI:10.1016/j.exer.2014.03.008.
- [9] Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2006, 90(3): 262-267. DOI:10.1136/bjo.2005.081224.
- [10] Mazza M, Capuano A, Bria P, et al. Ginkgo biloba and donepezil: a comparison in the treatment of Alzheimer's dementia in a randomized placebo-controlled double-blind study [J]. *Eur J Neurol*, 2006, 13(9): 981-985. DOI:10.1111/j.1468-1331.2006.01409.x.
- [11] Francis BA, Du LT, Najafi K, et al. Histopathologic features of conjunctival filtering blebs [J]. *Arch Ophthalmol*, 2005, 123(2): 166-170. DOI:10.1001/archophth.123.2.166.
- [12] Higginbotham EJ, Stevens RK, Musch DC, et al. Bleb-related endophthalmitis after trabeculectomy with mitomycin C [J]. *Ophthalmology*, 1996, 103(4): 650-656.
- [13] Ai J, Gao HH, He SZ, et al. Effects of matrine, artemisinin, tetrandrine on cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ in guinea pig ventricular myocytes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(6): 512-515.
- [14] 刘芬, 刘洁, 陈霞, 等. 氧化苦参碱的抗炎作用及其机制 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2005, 31(5): 728-730. Liu F, Liu J, Chen X, et al. Effect of oxymatrine on inflammation and its mechanism [J]. *J Jilin Univer (Med Ed)*, 2005, 31(5): 728-730.
- [15] 梁玉刚. 苦参素的药理作用研究进展 [J]. *中国药房*, 2005, 16(6): 465-466.
- [16] 马凌娣, 张彦, 文世宏, 等. 苦参碱对荷瘤小鼠抑瘤作用的实验研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(6): 339-341. Ma LD, Zhang Y, Wen SH, et al. Inhibition of tumor growth in tumor-bearing mice treated with matrine [J]. *Chin J Oncol*, 2005, 27(6): 339-341.
- [17] 刘丹岩, 马景学, 曹德英, 等. 苦参碱聚乳酸微球的缓释性和玻璃体腔注射的安全性研究 [J]. *眼科研究*, 2010, 28(1): 34-38. DOI:10.3969/j.issn.1003-0808.2010.01.010. Liu DY, Ma JX, Cao DY, et al. Sustained release ability and safety of matrine polyactic acid microsphere intravitreal injection [J]. *Chin Ophthalm Res*, 2010, 28(1): 34-38. DOI:10.3969/j.issn.1003-0808.2010.01.010.
- [18] 姜孟臣, 陈虹. 苦参碱抗纤维化作用研究进展 [J]. *武警医学院学报*, 2003, 12(2): 145-146, 152. Jiang MC, Chen H. The researcher development of the anti-fibrosis action of matrine [J]. *Acta Acad Med Cpaf*, 2003, 12(2): 145-146, 152.
- [19] 刘丽娅, 马景学, 安建斌, 等. 姜黄素、丹参单体和苦参碱抑制 IL-1 β 诱导下兔 RPE 细胞增殖的体外实验研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(8): 699-704. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.006. Liu LY, Ma JX, An JB, et al. Inhibitory effect of curcumin, salvia miltiorrhiza and matrine on IL-1 β -induced proliferation of rabbit RPE cells *in vitro* [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(8): 699-704. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.006.
- [20] 金玉, 张宏文. 苦参碱及氧化苦参碱的抗纤维化作用研究进展 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2004, 5(8): 493-494.
- [21] Zhang JP, Zhang M, Jin C, et al. Matrine inhibits production and actions of fibrogenic cytokines released by mouse peritoneal macrophages [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(8): 765-768.
- [22] 付平, 冯梅, 张翥, 等. 苦参碱对单侧输尿管梗阻模型大鼠肾小管间质纤维化的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(2): 140-143. Fu P, Feng M, Zhang Z, et al. Experimental study on effect of matrine in alleviating renal tubulointerstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction model [J]. *Chin J Integrated Tradit Western Med*, 2006, 26(2): 140-143.
- [23] 刘丽娅, 马景学, 安建斌, 等. 姜黄素、丹参单体和苦参碱抑制 IL-1 β 诱导下兔 RPE 细胞增殖的体外实验研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(8): 699-704. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.006. Liu LY, Ma JX, An JB, et al. Inhibitory effect of curcumin, salvia miltiorrhiza and matrine on IL-1 β -induced proliferation of rabbit RPE cells *in vitro* [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(8): 699-704. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.006.
- [24] 刘丹岩, 马景学, 安建斌, 等. 苦参碱聚乳酸微球防治增生性玻璃体视网膜病变的研究 [J]. *眼科研究*, 2009, 27(11): 950-954. Liu DY, Ma JX, An JB, et al. Preventive effect of matrine polyactic acid microsphere on proliferative vitreoretinopathy [J]. *Chin Ophthalm Res*, 2009, 27(11): 950-954.
- [25] 汤苏阳, 黄高升. 中医药治疗瘢痕的研究进展 [J]. *中国美容医学*, 2000, 9(6): 469-471.
- [26] Zhang Y, Cui L, Guan G, et al. Matrine suppresses cardiac fibrosis by inhibiting the TGF- β /Smad pathway in experimental diabetic cardiomyopathy [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1775-1781. DOI:10.3892/mmr.2017.8054.
- [27] Jiang H, Hou C, Zhang S, et al. Matrine upregulates the cell cycle protein E2F-1 and triggers apoptosis via the mitochondrial pathway in K562 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 559(2-3): 98-108. DOI:10.1016/j.ejphar.2006.12.017.
- [28] Ulakcsai Z, Bagaméry F, Vincze I, et al. Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts [J]. *Croat Med J*, 2015, 56(2): 78-84.

(收稿日期: 2018-11-27 修回日期: 2019-03-22)

(本文编辑: 刘艳)