

· 实验研究 ·

丹参酮对大鼠睑板腺上皮细胞增生、分化及脂质合成的影响

赖清华¹ 高莹莹¹ 李炜² 左程友² 李庆民¹¹福建医科大学附属第二医院眼科,泉州 362000;²厦门大学眼科研究所 福建省眼科与视觉科学重点实验室 361102

通信作者:高莹莹,Email:gaoyingying1968@163.com

【摘要】 目的 观察不同剂量丹参酮的 2 种主要单体成分隐丹参酮和丹参酮 II A 对体外原代培养的 SD 大鼠睑板腺上皮细胞增生、分化及其脂质合成的影响。**方法** 取清洁级 2 月龄 SD 大鼠,分离取出双眼睑板腺组织并与 3T3 滋养细胞共培养 5 d。隐丹参酮和丹参酮 II A 用二甲基亚砜(DMSO)配制成不同浓度,按照培养液中添加的隐丹参酮和丹参酮 II A 浓度不同将混合培养的细胞分为 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 药物组、0.250 $\mu\text{mol/L}$ 药物组、0.500 $\mu\text{mol/L}$ 药物组、1.250 $\mu\text{mol/L}$ 药物组和 2.500 $\mu\text{mol/L}$ 药物组,分别加入相应浓度的隐丹参酮或丹参酮 II A 处理细胞 48 h,溶剂对照组仅加入相应体积的 DMSO 溶剂。采用免疫荧光染色法测定睑板腺组织冰冻切片和睑板腺细胞克隆细胞中角蛋白 14(K14)和 p63 的定位和表达;采用实时荧光定量 PCR 法检测睑板腺细胞克隆中 K16、细胞增殖相关抗原(Ki67)及 CCAAT 增强子结合蛋白 α (C/EBP α)的基因表达情况;采用结晶紫染色和油红 O 染色法分别评估睑板腺上皮细胞的克隆形成率和脂质合成情况。**结果** 睑板腺细胞体外原代培养至第 4~5 天可见克隆形成,至培养第 7 天克隆面积明显增大,克隆细胞中 p63 和 K14 蛋白表达阳性。与溶剂对照组比较,0.500 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组、1.250 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组和 2.500 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组 Ki67 mRNA 相对表达量明显升高,0.500 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮 II A 组和 1.250 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮 II A 组细胞中 Ki67 mRNA 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);不同浓度隐丹参酮或丹参酮 II A 组细胞中 K16 和 C/EBP α mRNA 相对表达量总体比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。睑板腺细胞克隆内未见油红 O 染色,克隆边缘交界处细胞团出现堆积状油红 O 阳性染色。1.250 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组睑板腺细胞平均克隆形成率为 $(2.55 \pm 0.20)\%$,高于溶剂对照组的 $(2.05 \pm 0.13)\%$,差异有统计学意义($t = 4.379, P < 0.05$);1.250 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮 II A 组睑板腺细胞的平均克隆形成率为 $(2.25 \pm 0.20)\%$,与溶剂对照组比较差异无统计学意义($t = 1.616, P > 0.05$)。**结论** 隐丹参酮和丹参酮 II A 可以促进睑板腺细胞增生,但不影响睑板腺上皮细胞的分化及脂质合成。隐丹参酮可促进睑板腺细胞体外克隆的形成。

【关键词】 丹参酮; 睑板腺上皮细胞; 增生; 分化; 脂质代谢/药物作用; 细胞培养**基金项目:** 福建省医学创新课题项目 (2017-CXB-8); 福建省眼科与视觉科学重点实验室开放课题项目 (2016001)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.006

The effect of tanshinone on meibomian gland cell proliferation, differentiation and lipid synthesis

Lai Qinghua¹, Gao Yingying¹, Li Wei², Zuo Chengyou², Li Qingmin¹¹Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China;²Eye Institute of Xiamen University, Fujian Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Xiamen 361102, China

Corresponding author: Gao Yingying, Email: gaoyingying1968@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of cryptotanshinone and tanshinone II A, two major monomer components of tanshinone, on the proliferation, differentiation and lipid synthesis of rat meibomian gland epithelial cells *in vitro*. **Methods** The eyelid meibomian gland tissue was isolated from 2-month-old SD rats and co-cultured with 3T3 trophoblasts for 5 days. Cryptotanshinone and tanshinone II A were prepared with DMSO into different concentrations. The cells were grouped to 0.125 $\mu\text{mol/L}$, 0.250 $\mu\text{mol/L}$, 0.500 $\mu\text{mol/L}$, 1.250 $\mu\text{mol/L}$ and 2.500 $\mu\text{mol/L}$ drug groups and treated for 48 hours, respectively. Only dimethyl sulfoxide (DMSO) was added in medium in the DMSO control group. The expressions of keratin 14 (K14) and p63 in frozen sections of meibomian gland tissue and

clones of meibomian gland cells were detected by immunofluorescence. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to assay the relative expression of K16, cell proliferation related antigen 67 (Ki67) and CCAAT enhancer binding protein α (C/EBP α) in meibomian gland cell clones. Crystal violet staining and oil red staining were used to evaluate the colony formation rate and lipid synthesis of meibomian gland epithelial cells. **Results** Primary cultured meibomian gland cells were cloned on day 4–5 *in vivo*, and the cloning area was increased on day 7 after culture, p63 and K14 were positively expressed in clones. Compared with the DMSO control group, the relative expression levels of Ki67 mRNA were significantly elevated in the 0.500 $\mu\text{mol/L}$, 1.250 $\mu\text{mol/L}$ and 2.500 $\mu\text{mol/L}$ cryptotanshinone groups (all at $P < 0.05$). The relative expressions of Ki67 mRNA in the 0.500 $\mu\text{mol/L}$ and 1.250 $\mu\text{mol/L}$ tanshinone II A groups were significantly higher than those in the DMSO control group (all at $P < 0.05$). No significant difference was found in the relative expression of K16 and C/EBP α mRNA among different concentrations of cryptotanshinone or tanshinone II A group (all at $P > 0.05$). No lipid drop was found in the tarsal gland cell clones; however, the accumulation of lipid was seen in the cell clusters at the margin of the clones by oil red O staining. The average clone formation rate of tarsal gland cells in the 1.250 $\mu\text{mol/L}$ cryptotanshinone group was $(2.55 \pm 0.20)\%$, which was significantly higher than $(2.05 \pm 0.13)\%$ in the DMSO control group ($t = 4.379, P < 0.05$). The average clone formation rate of tarsal gland cells in the 1.250 $\mu\text{mol/L}$ tanshinone II A group was $(2.25 \pm 0.20)\%$, there was no significant difference between 1.250 $\mu\text{mol/L}$ tanshinone II A group and DMSO control group ($t = 1.616, P > 0.05$). **Conclusions** Cryptotanshinone and tanshinone II A promote the proliferation of meibomian gland epithelial cells, but play less impacts to lipid synthesis of meibomian gland epithelial cells *in vitro*. cryptotanshinone promote the clone formation of meibomian gland epithelial cells.

[Key words] Tanshinone; Meibomian gland epithelial cells; Proliferation; Differentiation; Lipid metabolism/drug effects; Cell culture

Fund program: Medical Innovation Projects of Fujian Province (2017-CXB-8); Open Project of Fujian Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science (2016001)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.006

睑板腺是位于眼睑的特殊类型皮脂腺,主要功能是合成泪膜表面的脂质成分。睑板腺功能障碍(meibomian gland dysfunction, MGD)是常见的眼表疾病,常因睑板腺结构和功能异常导致脂质合成质或量的异常,进而影响泪膜的稳定性,引起眼部刺激症状^[1]。MGD是脂质缺乏性干眼的主要原因。目前MGD的治疗方法主要是热敷和睑板腺按摩等物理疗法及人工泪液点眼,病情严重患者可口服四环素、阿奇霉素等抗生素^[2]。近年来睑板腺热脉冲光(intensive pulse light, IPL)也已用于MGD的治疗^[3-4]。这些治疗方法各有优缺点,但尚未有一种方法能够完全治愈MGD。临床研究发现,部分脂溢型MGD患者常并发红斑痤疮^[5],临床工作中也发现这些患者服用丹参酮治疗红斑痤疮时MGD症状得到缓解。丹参酮的主要单体成分为隐丹参酮和丹参酮II A,相关研究发现这些单体成分可直接抑制皮脂腺细胞的增生、脂质合成或间接下调皮脂腺细胞雄激素受体mRNA的表达,从而发挥抑制皮脂腺活性的作用^[6],但其对睑板腺是否具有类似作用尚不清楚。本研究中拟观察隐丹参酮和丹参酮II A对睑板腺上皮细胞增生、分化及脂质合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级2月龄Spargue-Dawley (SD) 雌性大鼠40只, 体重220~260 g(上海斯莱克实验动物有限公司), 饲养于厦门大学医学院实验动物中心。实验过程遵循厦门大学医学院动物中心关于实验动物使用的管理条例和原则。

1.1.2 细胞、主要试剂及主要仪器 3T3细胞系(厦门大学眼科研究所提供); 牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、DMEM/F12、DMEM基础培养基(美国Gibco公司); 隐丹参酮、丹参酮II A(上海诗丹德标准技术有限公司); 兔抗大鼠/人角蛋白14(keratin 14, K14)多克隆抗体(ab181595)、兔抗大鼠/人p63多克隆抗体(ab124762)、抗兔FITC荧光二抗(美国Abcam公司); 油红O染色试剂盒(美国Sigma公司)。双目手术显微镜(德国Carl Zeiss公司); 解剖显微镜(日本Nikon公司); 荧光共焦显微镜(日本Olympus公司); 实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystem公司)。

1.2 方法

1.2.1 睑板腺细胞克隆培养 将-80℃冻存的3T3细胞于37℃水浴中快速融化复苏, 置DMEM基础培

培养基中于 37 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中进行培养,每 2~3 天换液 1 次;培养 72 h,倒置显微镜下观察细胞形态,待细胞长至培养皿面积 80%~90% 进行传代,用 10 mg/ml 丝裂霉素处理 2 h 备用。颈椎脱臼法处死 SD 大鼠,于双目手术显微镜下分离双侧上下眼睑皮肤与睑板腺组织,取带有睑结膜和睫毛的睑板腺部分组织,用经 PBS 稀释 10 倍的碘伏浸泡 5 min, PBS 冲洗 1 遍,装有 1 ml 新鲜 DMEM 基础培养基的 EP 管中暂时存放;解剖显微镜下再次分离睑板腺组织,用眼科剪剪去睑结膜及带有睫毛的毛囊腺及皮脂腺,将深层睑板腺组织块剪成 1~2 mm³,置于含 2 mg/ml 胶原酶 IV 的消化液中在 37 ℃、含 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中消化 4 h;将消化后的组织吹打成单个细胞,与用丝裂霉素处理过的 3T3 细胞系以 1:2 000 比例混合,培养的 SD 大鼠睑板腺细胞密度和 3T3 细胞密度分别为 2×10³ 个/ml 和 4×10⁶ 个/ml,分别接种于 24 孔和 12 孔培养板进行体外培养。

1.2.2 实验分组 用 DMSO 将隐丹参酮或丹参酮 II A 配置成不同浓度,于培养后 5 d 取克隆形成的原代细胞,分别在培养液中加入 0.125、0.250、0.500、1.250 和 2.500 μmol/L 隐丹参酮或丹参酮 II A 各 1 ml,作为不同浓度药物实验组,溶剂对照组仅加入相应体积的 DMSO,继续培养 48 h。

1.2.3 免疫荧光染色法检测细胞中 K14 和 p63 的表达 取 SD 大鼠睑板腺组织标本冰冻切片和用质量分数 4% 多聚甲醛固定的各组睑板腺细胞克隆, PBS 冲洗 5 min;加入体积分数 0.2% Triton X-100,破膜 20 min; PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;用质量分数 2% BSA 液封闭 1 h;加入 1% BSA 稀释的 p63 (1:50) 和 K14 (1:50) 一抗,置于湿盒中 4 ℃ 孵育过夜; PBS 冲洗 3 次,每次 10 min,添加用 1% BSA 抗体稀释液稀释的荧光二抗 (1:1 000),室温下避光孵育 1 h; PBS 冲洗 3 次,每次 10 min,用含有 DAPI 的封片剂进行封片,4 ℃ 冰箱中避光保存;在荧光共焦显微镜下观察。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 K16、Ki67 及 CCAAT 增强子结合蛋白 α 的表达 取各组处理后 48 h 的睑板腺细胞,用 Trizol 裂解细胞后提取 RNA,逆转录成 cDNA,用实时荧光定量 PCR 仪检测 K16、Ki67 及 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAA/enhancer-binding protein α, C/EBPα) mRNA 的相对表达量。K16、Ki67 和 C/EBPα 引物由 PubMed NCBI 基因库在线设计,并通过 Primer Blast 在线核对相应种属特异性后由上海生工生物工程公司合成 (表 1)。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 10 s;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火及延伸 35 s,共循

环 40 次。以 β-catenin 作为内参照,用 2^{-ΔΔCt} 法计算各目的基因相对表达量。

表 1 各基因引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
K16	F: CCCAGATCCAGGTTTGA R: CCAGCCGAGTCTTCACAT
Ki67	F: CCTGCCCGACCTACAAAAT R: AAAATCTCTGAGCGGTGGG
C/EBPα	F: GCGGGAACGCAACAACA R: GATCCAGCGACCTAAACCATC
β-catenin	F: CACCCGCGAGTACAACCTTC R: CCCATACCCACCATCACACC

注: F: 正义链; R: 反义链; K16: 角蛋白 16; Ki67: 细胞增生相关抗原 67; C/EBPα: CCAAT/增强子结合蛋白; β-catenin: β-连环蛋白; Tm: DNA 溶解温度

1.2.5 油红 O 染色检测睑板腺细胞的脂质分泌情况 取 1.250 μmol/L 隐丹参酮组、丹参酮 II A 和对照组培养细胞,于药物干预后 48 h 吸弃 24 孔板培养板中的培养基, PBS 冲洗 1 次;每孔加入质量分数 10% 多聚甲醛 200 μl 固定 30 min; PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;体积分数 60% 异丙醇浸渍 30 s;油红 O 工作液浸染 15 min;60% 异丙醇冲洗,直到分化至背景色为无色,双蒸水洗 1 次;苏木素复染核 5 min,用预冷双蒸水冲洗,吸干水分;H-1000 封片剂进行封片,于光学显微镜下观察细胞内脂滴情况。

1.2.6 结晶紫染色检测睑板腺细胞的克隆形成率 新鲜配制质量分数 0.05% 结晶紫染色液,在 0.45 目的尼龙滤网过滤后备用;将睑板腺细胞以 2×10³/ml 密度接种至 12 孔板,各组细胞分别设 4 个复孔,于培养后 48 h 吸弃培养基, PBS 冲洗 2 遍,吹打掉 3T3 细胞;每孔加入 10% 多聚甲醛 200 μl 固定 20 min; PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;每孔加入 1 ml 结晶紫染液,浸染 30 min;自来水冲洗至背景分为无色;通风干燥后观察并计数每孔中的克隆数目,计算各组睑板腺细胞克隆形成率。克隆形成率 = (克隆数目/细胞总数目) × 100%。实验重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析,采用 Graphpad-Prism 6.0 进行统计及作图。本研究中测量指标的计量资料经 W 检验呈正态分布,以 mean±SD 表示;经 Levene 检验方差齐性。不同药物及浓度组细胞中 K16、Ki67 和 C/EBPα mRNA 相对表达量及平均克隆形成率总体比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Dunnett-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养睑板腺细胞和 3T3 细胞的形态

细胞混合培养后 24 h 可见 3T3 细胞形成网状, 铺满培养板(图 1A)。培养第 4~5 天睑板腺细胞克隆形成, 推挤 3T3 细胞形成小的克隆圈, 睑板腺细胞则均匀分散在 3T3 细胞形成的网状结构中(图 1B)。培养第 6~7 天细胞数量明显增加, 细胞克隆面积显著增大, 克隆生长速度明显加快(图 1C)。不同克隆圈之间相互接触后融合细胞生长速度逐渐减慢, 部分停止生长(图 1D)。

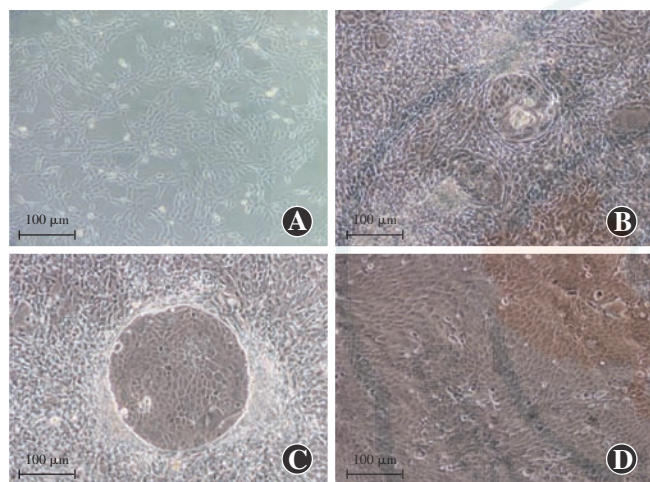


图 1 光学显微镜下培养的睑板腺细胞和 3T3 细胞形态($\times 100$, 标尺=100 μm) A: 混合克隆培养后 24 h, 3T3 细胞形成网状, 铺满培养板 B: 混合培养 4~5 d, 可见睑板腺细胞克隆团形成 C: 混合培养 6 d, 细胞克隆面积明显增大 D: 混合培养后 7 d, 不同克隆圈相互接触

2.2 大鼠睑板腺组织和培养的睑板腺细胞中 K14 和 p63 免疫荧光染色情况

免疫荧光染色结果显示, 睑板腺腺泡细胞和克隆培养的睑板腺细胞 K14 均表达阳性, 睑板腺组织中 K14 荧光强度明显强于克隆培养的睑板腺细胞; 睑板腺腺泡中部分上皮细胞和睑板腺细胞克隆中 p63 均表达阳性, 睑板腺组织中 p63 荧光染色明显强于睑板腺克隆(图 2)。

2.3 不同浓度隐丹参酮组细胞中 K16、Ki67 和 C/EBP α mRNA 相对表达量变化

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 各浓度隐丹参酮组细胞中 Ki67 mRNA 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义($F = 121.278, P < 0.05$), K16 mRNA 和 C/EBP α mRNA 相对表达量总体比较差异无统计学意义($F = 5.427, 1.678$, 均 $P > 0.05$); 0.500、1.250 和 2.500 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组细胞中 Ki67 mRNA 相对表达量明显高于溶剂对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)(表 2)。

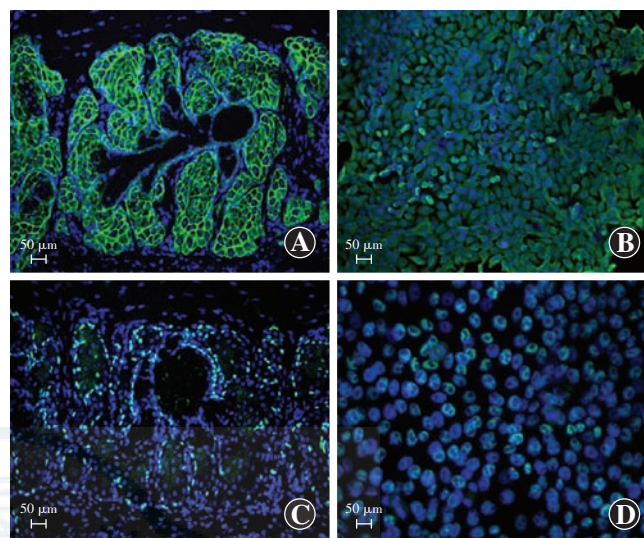


图 2 大鼠睑板腺组织和睑板腺克隆细胞中 K14 和 p63 的表达及分布(FITC $\times 200$, 标尺=50 μm) A: 睑板腺组织中 K14 表达于睑板腺腺泡中, 呈绿色荧光 B: 睑板腺细胞克隆中 K14 荧光强度弱于睑板腺组织 C: 睑板腺组织中部分上皮细胞 p63 表达阳性, 呈蓝色荧光 D: 睑板腺克隆细胞中 p63 阳性细胞数目多于睑板腺组织

表 2 不同浓度隐丹参酮组睑板腺细胞 K16、Ki67 和 C/EBP α mRNA 相对表达量比较(mean $\pm$ SD)

组别	样本量	K16 mRNA 相对表达量	Ki67 mRNA 相对表达量	C/EBP α mRNA 相对表达量
溶剂对照组	3	1.001 $\pm$ 0.055	1.009 $\pm$ 0.158	1.100 $\pm$ 0.011
0.125 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组	3	1.072 $\pm$ 0.014	1.110 $\pm$ 0.071	1.113 $\pm$ 0.020
0.250 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组	3	1.073 $\pm$ 0.047	1.097 $\pm$ 0.123	1.173 $\pm$ 0.106
0.500 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组	3	1.102 $\pm$ 0.031	2.552 $\pm$ 0.155 [*]	1.152 $\pm$ 0.056
1.250 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组	3	1.212 $\pm$ 0.028	2.953 $\pm$ 0.145 [*]	1.195 $\pm$ 0.049
2.500 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组	3	1.119 $\pm$ 0.057	1.637 $\pm$ 0.142 [*]	1.112 $\pm$ 0.015
5.000 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮组	3	1.058 $\pm$ 0.060	1.080 $\pm$ 0.034	1.089 $\pm$ 0.052
F 值		5.427	121.278	1.678
P 值		>0.05	<0.01	>0.05

注: 与溶剂对照组比较, ^{*} $P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett- t 检验)

K16: 角蛋白 16; Ki67: 细胞增生相关抗原; C/EBP α : CCAAT/增强子结合蛋白 α

2.4 不同浓度丹参酮 II A 组细胞中 K16、Ki67 和 C/EBP α mRNA 相对表达量变化

实时定量荧光 PCR 检测结果显示, 各浓度丹参酮 II A 组细胞中 Ki67 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 18.788, P < 0.05$), K16 和 C/EBP α mRNA 相对表达量总体比较差异无统计学意义($F = 2.424, 0.820$, 均 $P > 0.05$), 与溶剂对照组比较, 0.500 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮 II A 组和 1.250 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮 II A 组细胞中 Ki67 mRNA 相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 3)。

表 3 不同浓度丹参酮 II A 组睑板腺细胞中 K16、Ki67 和 C/EBP α mRNA 相对表达量比较 (mean $\pm$ SD)

组别	样本量	K16 mRNA 相对表达量	Ki67 mRNA 相对表达量	C/EBP α mRNA 相对表达量
溶剂对照组	3	1.050 $\pm$ 0.038	1.000 $\pm$ 0.031	1.116 $\pm$ 0.024
0.125 μ mol/L 丹参酮 II A 组	3	1.083 $\pm$ 0.036	0.094 $\pm$ 0.024	1.146 $\pm$ 0.008
0.250 μ mol/L 丹参酮 II A 组	3	1.115 $\pm$ 0.017	1.079 $\pm$ 0.109	1.148 $\pm$ 0.063
0.500 μ mol/L 丹参酮 II A 组	3	1.136 $\pm$ 0.324	1.266 $\pm$ 0.062 ^a	1.180 $\pm$ 0.056
1.250 μ mol/L 丹参酮 II A 组	3	1.134 $\pm$ 0.056	1.380 $\pm$ 0.085 ^a	1.165 $\pm$ 0.023
2.500 μ mol/L 丹参酮 II A 组	3	1.123 $\pm$ 0.028	1.120 $\pm$ 0.044	1.163 $\pm$ 0.019
5.000 μ mol/L 丹参酮 II A 组	3	1.096 $\pm$ 0.023	1.010 $\pm$ 0.034	1.170 $\pm$ 0.058
F 值		2.424	18.788	0.820
P 值		>0.05	<0.01	>0.05

注:与溶剂对照组比较,^a $P<0.01$ (单因素方差分析,Dunnett- t 检验)

K16:角蛋白 16;Ki67:细胞增生相关抗原;C/EBP α :CCAAT/增强子结合蛋白 α

2.5 各组睑板腺细胞中脂肪组织分布

油红 O 染色结果显示,混合培养后 7 d,不同浓度药物处理组睑板腺克隆细胞中均未见阳性染色(图 3),克隆边缘交界处细胞团出现油红 O 染色阳性,呈堆积状,考虑为与睑板腺细胞共同培养的 3T3 细胞(图 4)。

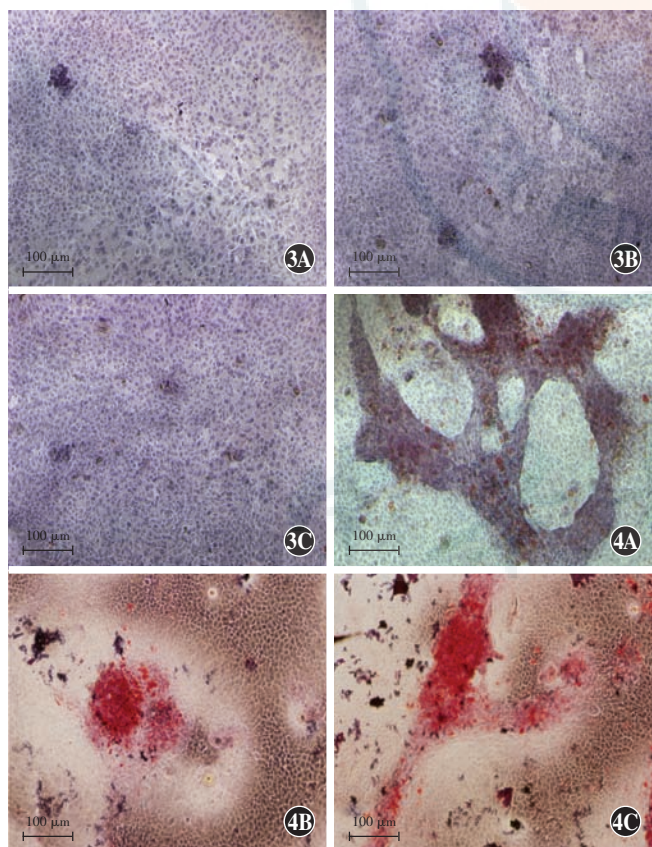


图 3 各组睑板腺克隆细胞中脂肪分布(油红 O 染色, $\times 100$,标尺=100 μ m) A:溶剂对照组未见染色阳性细胞 B:1.250 μ mol/L 隐丹参酮组未见染色阳性细胞 C:1.250 μ mol/L 丹参酮 II A 组未见染色阳性细胞 图 4 各组 3T3 细胞中脂肪滴分布(油红 O 染色, $\times 100$,标尺=100 μ m) A:溶剂对照组未见染色阳性细胞 B:1.250 μ mol/L 隐丹参酮组克隆边缘可见染色阳性细胞 C:1.250 μ mol/L 浓度丹参酮 II A 组可见较多的染色阳性区域

2.6 睑板腺细胞的克隆形成率

1.250 μ mol/L 隐丹参酮或丹参酮 II A 组及溶剂对照组睑板腺细胞可见较多克隆形成,呈深紫色染色团(图 5)。1.250 μ mol/L 隐丹参酮组睑板腺细胞平均克隆形成率为(2.55 $\pm$ 0.20)%,高于溶剂对照组的(2.05 $\pm$ 0.13)%,差异有统计学意义($t=4.379$, $P=0.005$);1.250 μ mol/L 丹参酮 II A 组睑板腺细胞的平均克隆形成率为(2.25 $\pm$ 0.20)%,与溶剂对照组比较,差异无统计学意义($t=1.616$, $P>0.05$)。

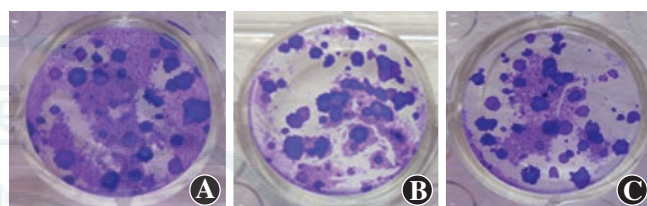


图 5 睑板腺克隆细胞形成情况 睑板腺细胞培育后形成大小不一的克隆细胞团块,呈深紫色染色 A:溶剂对照组 B:1.250 μ mol/L 隐丹参酮组 C:1.250 μ mol/L 丹参酮 II A 组

3 讨论

睑板腺是睑板内的全分泌腺体,是一种特殊类型的皮脂腺,因而与皮脂腺具有许多共同特性。睑板腺与毛囊附近的皮脂腺具有相似特征,在发育过程中具有与皮肤附属器类似的角蛋白标志物^[7]。所有处于发育过程中的以及成熟的小鼠睑板腺基底上皮细胞均表达 K14,其与 K5 配对,共同形成中间纤维构成的细胞骨架^[8-9]。与皮脂腺细胞一样,睑板腺细胞在合成和分泌脂质之前先分化并且向腺泡中间方向移动,这些终末分化的睑板腺细胞合成并积累脂质,表达大量的过氧化物酶增生因子激活受体,然后细胞退化,细胞膜和核质崩解^[10]。睑板腺腺泡细胞的分化和破坏需要基底细胞的不间断更替,表明睑板腺与其他上皮组织一样,存在近端干细胞以提供自我更新的细胞来源^[11-12]。成体干细胞是近似静止的或者很少分裂,但在细胞培养过程中可以迅速增生^[13]。

唇形科植物丹参酮是治疗红斑痤疮的常用药,该药物起主要作用的成分是单体隐丹参酮和丹参酮 II A 这 2 种单体。隐丹参酮的醇质体在磷脂层中有很好的流动性,能够迅速到达皮肤,发挥药理作用^[14],常用于皮肤科痤疮的治疗。丹参酮 II A 可抑制肿瘤细胞的增生,通过血红蛋白加氧酶-1 抑制肝硬化大鼠模型的炎症反应、氧化应激和细胞凋亡^[15-16],能有效抑制细胞内脂质过氧化产物与 DNA 的相互作用,抑制 DNA 加成物的生成,保护 DNA。实验研究证实,这 2 种单体

成分能够抑制皮脂腺细胞的增生、脂质合成及下调皮脂腺细胞雄激素受体 mRNA 的表达,抑制皮脂过多分泌,从而达到治疗痤疮的目的^[5]。

3T3 细胞系是一种由 Swiss 系小鼠胚胎分离出来的永久成纤维细胞系,无恶性病理过程,是细胞与其他细胞进行共同培养的良好配选细胞系。在最初培育睑板腺细胞时我们采用了常用的单细胞类培养方法,发现睑板腺细胞容易在培养液中悬浮,贴壁困难,培养结果不理想。根据 Yu 等^[17]开发的体外原代睑板腺细胞共培养模型发现,3T3 细胞系在共同培养过程中形成网状结构克隆圈,可为睑板腺细胞的贴壁和生长提供支架,且由于 3T3 细胞系具有稳定的生理特性,在培育后期容易通过差异消化、机械吹打等方式进行双向分离,而不影响实验结果。在分离睑板腺组织时,我们在手术显微镜下完整分离了睑板表面的皮肤组织、皮脂腺组织、睑结膜组织以及睑缘组织,仅获取深部的睑板腺组织,从而避免了眼表其他组织的混入。

本研究中将 SD 大鼠睑板腺细胞与 3T3 共同进行原代培养,培养的细胞 K14 和 p63 表达阳性。K14 是睑板腺常用的细胞标志物之一,在睑板腺上皮细胞发育的各个阶段均呈阳性表达^[18];p63 和 p53 具有同源性,可维持上皮基底层标志物 K14 的表达,近年来的研究中发现 p63 可在皮肤和角膜缘干细胞的基底部特异性表达,是睑板腺细胞常用的标志物之一^[19]。本研究结果显示,SD 大鼠睑板腺组织 K14 和 p63 均表达阳性,在克隆培养的睑板腺细胞中 K14 和 p63 荧光染色结果与组织中的荧光染色结果一致,表明培养的细胞为睑板腺上皮细胞。

本研究中发现,共培养的细胞在培养后 4~5 d 睑板腺细胞开始有克隆形成,培养后约 7 d 细胞处于指数增长期,故本研究选择在此时加入不同浓度的隐丹参酮和丹参酮 II A 进行干预。

K16 主要表达于承重部位的组织中,如哺乳动物足底上皮细胞,而在机体创伤、炎症以及肿瘤上皮细胞高分化状态下常会导致 K16 的高表达,因此 K16 是上皮细胞处于分化状态的重要标志^[20-21]。Ki67 是一种 DNA 结合蛋白,是反映组织细胞增生活性的重要指标,其基因表达水平与细胞有丝分裂有关^[22]。作为细胞有丝分裂时染色体外围的一个组分,Ki67 可以防止染色体在核膜裂解时形成单独的染色质团块,从而使染色体在有丝分裂时能够独立运动并与纺锤体相互作用。本研究以 K16 作为证实睑板腺细胞处于分化状态的评估指标,以 Ki67 作为反映细胞增生活性的指标。C/EBP α 是 CCAAT 增强子结合蛋白家族中的一

员,可通过与过氧化物酶体增殖物激活受体相互作用来调节脂肪细胞的分化^[23-24]。C/EBP α 在肝脏、脂肪组织、肠道、肺脏、肾上腺及胎盘等磷脂和胆固醇合成活跃的组织中呈高表达,因而本研究中选择 C/EBP α 作为评估与脂质合成相关的睑板腺上皮细胞分化的另一个指标。

本研究中结果显示,用 1.250 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮处理睑板腺细胞促进 K16 基因的表达,0.500 $\mu\text{mol/L}$ 、1.250 $\mu\text{mol/L}$ 和 2.500 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮处理细胞后可促进睑板腺细胞中 Ki67 基因的表达,0.500 $\mu\text{mol/L}$ 和 1.250 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮 II A 对睑板腺细胞中 Ki67 基因的表达也有促进作用,而不同浓度的隐丹参酮和丹参酮 II A 处理后对细胞中 C/EBP α 基因表达量无明显影响,提示隐丹参酮和丹参酮 II A 可能在一定浓度范围内对睑板腺上皮细胞的增生发挥促进作用,但对睑板腺上皮细胞的分化尚未见明显的影响,与鞠强等^[6]报道的隐丹参酮和丹参酮 II A 可抑制皮脂腺细胞增生及脂质合成的结论不同,推测其原因可能是由于 MGD 病理表现为腺体萎缩及腺管退行性改变,与皮脂腺功能异常的腺体增生、分泌功能亢进有所不同,或者可能与两者组织结构和生理功能存在差异,从而使得丹参酮对它们的作用不同有关。

本研究中结果显示,睑板腺细胞的油红 O 染色结果均为阴性,细胞中均未见脂质合成,细胞不同克隆边缘交界处细胞团可见油红 O 阳性染色,考虑脂滴来自与睑板腺细胞共同培养的 3T3 细胞,推测本研究中原代培养的睑板腺上皮细胞还处于原始增生状态,尚未分化为有特定功能的细胞,因此不具有合成和分泌脂质的功能,而睑板腺的干细胞中分化为睑板腺前体细胞的数量极其有限,这可能是其在衰老和其他环境因素中容易耗竭的原因^[25]。由于未经处理的 3T3 尚未分化成熟,并不能用于实验,本研究中采用的 3T3 细胞系是诱导分化成熟的细胞,已具有体外合成脂质的功能,油红 O 染色呈阳性^[26]。鉴于体外原代培养的未分化睑板腺细胞不具有合成脂质的功能,因而丹参酮对睑板腺细胞合成脂质功能的影响还有待进一步研究。

本研究中采用结晶紫染色评估睑板腺细胞克隆形成率的变化,结果显示 1.250 $\mu\text{mol/L}$ 隐丹参酮睑板腺细胞的平均克隆形成率略高于溶剂对照组。

总之,本研究的体外实验证实一定浓度的隐丹参酮和丹参酮 II A 具有促进睑板腺细胞增生的作用,但对于睑板腺细胞的分化及其脂质分泌的影响并不明显,隐丹参酮对睑板腺细胞体外克隆形成有促进作用,推测丹参酮对 MGD 可能具有一定的潜在治疗价值。

然而,丹参酮单体成分对睑板腺生理功能产生影响的具体机制及可能的信号传导通路还有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nelson JD, Shimazaki J, Benitez-del-Castillo JM, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction; report of the definition and classification subcommittee [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(4): 1930-1937. DOI: 10.1167/iov.10-6997b.
- [2] Foulks GN, Borchman D, Yappert M, et al. Topical azithromycin therapy for meibomian gland dysfunction: clinical response and lipid alterations [J]. Cornea, 2010, 29(7): 781-788. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181cda38f.
- [3] Lane SS, DuBiner HB, Epstein RJ, et al. A new system, the LipiFlow, for the treatment of meibomian gland dysfunction [J]. Cornea, 2012, 31(4): 396-404. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318239a9ea.
- [4] Jiang X, Lv H, Song H, et al. Evaluation of the safety and effectiveness of intense pulsed light in the treatment of meibomian gland dysfunction [J/OL]. J Ophthalmol, 2016, 2016: 1910694 [2018-07-11]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27413540. DOI: 10.1155/2016/1910694.
- [5] Machalińska A, Zakrzewska A, Markowska A, et al. Morphological and functional evaluation of meibomian gland dysfunction in rosacea patients [J]. Curr Eye Res, 2016, 41(8): 1029-1034. DOI: 10.3109/02713683.2015.1088953.
- [6] 鞠强, 尹兴平, 石继海, 等. 丹参酮对皮肤腺细胞增殖、脂质合成及雄性激素受体 mRNA 表达的影响 [J]. 中华皮肤科杂志, 2005, 38(2): 98-101.
Ju Q, Yin ZP, Shi JH, et al. Effects of cryptotanshinone and tanshinone A on proliferation, lipid synthesis and expression of androgen receptor mRNA in Human Sebocytes *in vitro* [J]. Chin J Dermatol, 2005, 38(2): 98-101.
- [7] Knop E, Knop N, Millar T, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction; report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(4): 1938-1978. DOI: 10.1167/iov.10-6997c.
- [8] Call M, Fischesser K, Lunn MO, et al. A unique lineage gives rise to the meibomian gland [J]. Mol Vis, 2016, 22: 168-176.
- [9] Parfitt GJ, Xie Y, Geyfman M, et al. Absence of ductal hyperkeratinization in mouse age-related meibomian gland dysfunction (ARMGD) [J]. Aging (Albany NY), 2013, 5(11): 825-834. DOI: 10.18632/aging.100615.
- [10] Parfitt GJ, Lewis PN, Young RD, et al. Renewal of the Holocrine meibomian glands by label-retaining, unipotent epithelial progenitors [J]. Stem Cell Reports, 2016, 7(3): 399-410. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.07.010.
- [11] Guasch G, Blanpain C. Defining the epithelial stem cell niche in skin [J]. Med Sci (Paris), 2004, 20(3): 265-267. DOI: 10.1051/medsci/2004203265.
- [12] Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis [J]. Cell, 1990, 61(7): 1329-1337.
- [13] Fuchs E, Horsley V. Ferreting out stem cells from their niches [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(5): 513-518. DOI: 10.1038/ncb0511-513.
- [14] Yu Z, Lv H, Han G, et al. Ethosomes loaded with cryptotanshinone for acne treatment through topical gel formulation [J/OL]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159967 [2018-06-12]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27441661. DOI: 10.1371/journal.pone.0159967.
- [15] Huang ST, Huang CC, Huang WL, et al. Tanshinone II A induces intrinsic apoptosis in osteosarcoma cells both in vivo and in vitro associated with mitochondrial dysfunction [J/OL]. Sci Rep, 2017, 7: 40382 [2018-08-22]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28106052. DOI: 10.1038/srep40382.
- [16] Shu M, Hu XR, Hung ZA, et al. Effects of tanshinone II A on fibrosis in a rat model of cirrhosis through heme oxygenase-1, inflammation, oxidative stress and apoptosis [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(4): 3036-3042. DOI: 10.3892/mmr.2016.4886.
- [17] Yu D, Davis RM, Aita M, et al. Characterization of rat meibomian gland ion and fluid transport [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(4): 2328-2343. DOI: 10.1167/iov.15-17945.
- [18] Call M, Fischesser K, Lunn MO, et al. A unique lineage gives rise to the meibomian gland [J]. Mol Vis, 2016, 22: 168-176.
- [19] Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(6): 3156-3161. DOI: 10.1073/pnas.061032098.
- [20] Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, et al. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16 [J]. J Cell Biol, 1996, 132(3): 381-397.
- [21] McGowan K, Coulombe PA. The wound repair-associated keratins 6, 16, and 17. Insights into the role of intermediate filaments in specifying keratinocyte cytoarchitecture [J]. Subcell Biochem, 1998, 31: 173-204.
- [22] Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes [J]. Nature, 2016, 535(7611): 308-312. DOI: 10.1038/nature18610.
- [23] Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation [J]. Biochem J, 2002, 365(Pt 3): 561-575. DOI: 10.1042/BJ20020508.
- [24] Rosen ED, Hsu CH, Wang X, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway [J]. Genes Dev, 2002, 16(1): 22-26. DOI: 10.1101/gad.948702.
- [25] Hwang HS, Parfitt GJ, Brown DJ, et al. Meibocyte differentiation and renewal: Insights into novel mechanisms of meibomian gland dysfunction (MGD) [J]. Exp Eye Res, 2017, 163: 37-45. DOI: 10.1016/j.exer.2017.02.008.
- [26] 郭秀玲, 徐民岗, 张秀丽, 等. 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞培养与诱导分化方法的建立 [J]. 中国药物与临床, 2013, 13(12): 1542-1544. DOI: 10.11655/zgywylc2013.12.008.
Guo XL, Xu MG, Zhang XL, et al. A novel approach for culture and induced differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes [J]. Chin Remedies Amp Clin, 2013, 13(12): 1542-1544. DOI: 10.11655/zgywylc2013.12.008.

(收稿日期: 2018-12-11 修回日期: 2019-02-20)

(本文编辑: 张宇)

读者 · 作者 · 编者

本刊对论文题目的要求

论文题目力求简洁、特异、明确,能准确反映文章主题和特定内容,具有可检索性。中文文题一般以 20 个汉字以内为宜,一般不设副标题,尽量不用标点符号,文题中避免使用不为同行熟知的符号、简称、缩略语和商品名。论著文章和综述须有与中文文题含意一致的英文文题。

(本刊编辑部)