

## · 实验研究 ·

姜黄素、丹参单体和苦参碱抑制 IL-1 $\beta$  诱导下兔 RPE 细胞增生的体外实验研究

刘丽娅 马景学 安建斌 刘丹岩 高彦军 周娜磊 马月磊

050000 石家庄,河北医科大学第二医院眼科

通信作者:马景学,Email:15803210925@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.006

**【摘要】** **背景** 增生性玻璃体视网膜病变(PVR)是临床上常见的致盲眼病。视网膜色素上皮(RPE)细胞是PVR发生和发展中的关键细胞,研究中药对体外培养RPE细胞的作用及原理对于防治PVR并揭示其发病机制具有重要意义。**目的** 研究姜黄素、丹参单体、苦参碱对白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )诱导的兔RPE细胞增生的抑制效果。**方法** 取第3~4代体外培养的有色兔RPE细胞,采用透射电子显微镜鉴定细胞结构。采用MTT法检测2.5、5.0、10.0、20.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$ 培养后24、48和72 h RPE细胞的增生率;并检测5、10、20  $\mu\text{g/ml}$ 姜黄素和丹参单体IH763-4以及100、200、400  $\mu\text{g/ml}$ 苦参碱对IL-1 $\beta$ 诱导RPE细胞增生的抑制率。采用线性回归分析计算各药物的半数抑制率(IC<sub>50</sub>)剂量。**结果** 初分离的兔RPE细胞呈球形,细胞中可见大量黑色素颗粒;第4代细胞色素颗粒明显减少,形态更加狭长。免疫细胞化学染色结果显示,细胞角蛋白(AE1/AE3)在细胞质表达呈阳性。透射电子显微镜下可见细胞顶端有大量的微绒毛,细胞间可见连接复合体。不同质量浓度IL-1 $\beta$ 组培养后24、48、72 h细胞增生率总体比较差异均有统计学意义( $F_{\text{时间}} = 30.33, P = 0.00; F_{\text{浓度}} = 9.37, P = 0.00$ );组内相邻培养时间点间细胞增生率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ ),同一培养时间点相邻质量浓度IL-1 $\beta$ 组间细胞增生率比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$ 培养72 h后细胞增生率达峰值。不同质量浓度姜黄素、丹参单体和苦参碱不同培养时间点细胞抑制率总体比较差异均有统计学意义(姜黄素: $F_{\text{时间}} = 128.75, P = 0.00; F_{\text{质量浓度}} = 334.05, P = 0.00$ 。丹参单体: $F_{\text{时间}} = 39.32, P = 0.00; F_{\text{质量浓度}} = 165.57, P = 0.00$ 。苦参碱: $F_{\text{时间}} = 267.76, P = 0.00; F_{\text{质量浓度}} = 912.34, P = 0.00$ )。3种药物对RPE细胞的抑制作用均呈明显的剂量和时间依赖性,组内相邻培养时间点间细胞抑制率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ ),相邻质量浓度药物组间细胞抑制率的比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。培养后24、48及72 h,姜黄素的IC<sub>50</sub>分别为26.77、19.01和9.45  $\mu\text{g/ml}$ ,丹参单体的IC<sub>50</sub>分别为33.72、23.47和12.56  $\mu\text{g/ml}$ ,苦参碱的IC<sub>50</sub>分别为570.96、352.25和97.50  $\mu\text{g/ml}$ 。**结论** IL-1 $\beta$ 可促进RPE细胞增生,10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$ 促增生作用最显著;姜黄素、丹参单体、苦参碱均可抑制IL-1 $\beta$ 诱导的RPE细胞增生,其抑制作用均呈时间和剂量依赖性,其中姜黄素抗增生作用最强。

**【关键词】** 视网膜色素上皮;白细胞介素-1;增生性玻璃体视网膜病变;姜黄素;丹参;苦参碱**Inhibitory effect of curcumin, salvia miltiorrhiza and matrine on IL-1 $\beta$ -induced proliferation of rabbit RPE cells in vitro**

Liu Liya, Ma Jingxue, An Jianbin, Liu Danyan, Gao Yanjun, Zhou Nalei, Ma Yuelei

Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: Ma Jingxue, Email: 15803210925@163.com

**【Abstract】** **Background** Proliferative vitreoretinopathy (PVR) is a common cause of vision loss clinically, and retinal pigment epithelium (RPE) cells play a major part in this disease. Studying the effect of traditional Chinese medicine on RPE cells are of great importance to reveal the pathogenesis and prevention of PVR, which were rarely reported. **Objective** This study was to study and compare the inhibition effect among curcumin, salvia miltiorrhiza and matrine on IL-1 $\beta$ -induced proliferation of rabbit RPE cells. **Methods** RPE cells at passages 3-4 were enrolled for the research and identified by transmission electron microscope. The proliferation effect of IL-1 $\beta$  (2.5, 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{g/L}$ ) and inhibitory effect of curcumin (5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$ ), salvia miltiorrhiza (5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) or matrine (100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ ) on RPE cells 24, 48 and 72 hours after cultivation were studied by MTT assay. The

50% inhibitory dose ( $IC_{50}$ ) of the three medicines were analyzed by regression analysis. The use and feeding of the experimental animals were followed by the ARVO Statement. **Results** RPE cells isolated from the rabbit eye were in round shape and abundant in melanin; The melanin significantly decreased in the fourth generations of RPE cells. Immunohistochemistry showed that the RPE cells was positive for keratin (AE1/AE3). The proliferation rates of RPE cells were statistically different among different concentrations of IL-1 $\beta$  24, 48 and 72 hours after cultivation ( $F_{time} = 30.33, P = 0.00; F_{concentration} = 9.37, P = 0.00$ ); The proliferation rates of RPE were significantly different among different time points or different concentrations of IL-1 $\beta$  (all at  $P < 0.05$ ). And the proliferation rate run up to maximum at 10  $\mu\text{g/L}$  after 72 hours of cultivation. The inhibitory rates of the three medicines were statistically different among different time points or different concentrations (curcumin:  $F_{time} = 128.75, P = 0.00; F_{concentration} = 334.05, P = 0.00$ . salvia miltiorrhiza:  $F_{time} = 39.32, P = 0.00; F_{concentration} = 165.57, P = 0.00$ . matrine:  $F_{time} = 267.76, P = 0.00; F_{concentration} = 912.34, P = 0.00$ ). The three medicines dose-dependently and time-dependently inhibit IL-1 $\beta$ -induced proliferation of RPE cells, with significant differences between the adjacent time points and concentrations (all at  $P < 0.05$ ). The  $IC_{50}$  were 26.77, 19.01 and 9.45  $\mu\text{g/ml}$  for curcumin; 33.72, 23.47 and 12.56  $\mu\text{g/ml}$  for salvia miltiorrhiza, 570.96, 352.25 and 97.50  $\mu\text{g/ml}$  for matrine 24, 48 and 72 hours after cultivation. **Conclusions** The proliferation of RPE cells can be stimulated by IL-1 $\beta$ , and the maximal proliferation occurred with a concentration of 10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$ . Curcumin, salvia miltiorrhiza and matrine dose-dependently and time-dependently inhibit proliferation of RPE cells induced by IL-1 $\beta$ . Curcumin is the best medicine to inhibit the proliferation of RPE cells.

[**Key words**] Retinal pigment epithelium; Interleukin-1; Proliferative vitreoretinopathy; Curcumin; Salvia miltiorrhizae; Matrine

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 多发生于孔源性视网膜脱离和视网膜复位术后, 是导致视网膜脱离手术失败的常见原因, 治疗以玻璃体视网膜手术为主, 但术后可因再次增生导致视网膜脱离复发, 从而严重影响患者视力预后。PVR 的病理过程大致可分为炎症期、增生期和瘢痕期, 炎症期是 PVR 的始动阶段, 此时大量炎性因子释放, 白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 作为主要炎性因子, 促进视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞的增生、移行和分化, 是 PVR 形成过程中的关键步骤<sup>[1]</sup>。药物防治 PVR 成为近年来的研究热点, 化学药物虽然其抗增生作用强大, 但作用单一, 且可能存在毒性作用和不良反应, 限制了其临床应用; 传统中药提取物姜黄素、丹参和苦参碱具有药源丰富、作用广泛、毒性作用小及不良反应少等优点, 有望成为防治 PVR 的理想用药。我们前期也分别对 3 种药物的抗 RPE 细胞增生作用进行了研究<sup>[2-4]</sup>, 但仍缺乏药物在早期炎症阶段抗增生作用的研究。本研究中利用 IL-1 $\beta$  刺激体外培养的 RPE 细胞模拟 PVR 炎症环境, 观察姜黄素、丹参单体和苦参碱对炎性因子诱导下 RPE 细胞增生的抑制作用, 评价这 3 种药物的作用效果和差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 有色成年家兔 6 只 (河北医科大学

实验动物中心提供), 雌雄不限, 体质量 2.5 ~ 3.0 kg。实验动物的使用符合 ARVO 的相关规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 重组人 IL-1 $\beta$  (美国 eBioscience 公司); 姜黄素 (纯度  $\geq 98.5\%$ , 美国 ALEXIS 公司); 丹参单体 IH763-4 (纯度  $\geq 98\%$ , 中国医学科学院血液病研究所); 苦参碱 (纯度  $\geq 98\%$ , 中国药品生物制品检定所); 鼠抗人细胞角蛋白 (AE1/AE3) 单克隆抗体 (北京中杉金桥公司); SP 免疫组织化学染色试剂盒 (北京博奥森公司); DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司); MTT、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国 Sigma 公司)。全自动酶标分析仪 (美国 Thermo 公司); H7500 型透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 兔 RPE 细胞的培养及鉴定 参照我们以往报道<sup>[5]</sup>, 无菌条件下摘除眼球, 弃去眼前节及玻璃体, 胰蛋白酶消化法收集 RPE 细胞进行原代培养并传代。取第 3 ~ 4 代处于对数生长期的细胞经胰蛋白酶消化后收集约  $1 \times 10^6$  个细胞, 离心, 去除培养基, 置于体积分数 3% 戊二醛和质量分数 1.5% 多聚甲醛混合液中固定, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 质量分数 1% 锇酸固定, 醋酸铀快染, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 枸橼酸铅染色, 透射电子显微镜下观察细胞超微结构并照相。

1.2.2 溶液配制 取 2 mg 姜黄素加入 40  $\mu\text{l}$  DMSO 助溶, 以 20 ml 无血清 DMEM 配制成 100  $\mu\text{g/ml}$ , 用前

稀释至实验所需终质量浓度;丹参单体和苦参碱以无血清 DMEM 分别配制成 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 2 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 用前稀释至实验所需终质量浓度。20  $\mu\text{l}$  IL-1 $\beta$  (2  $\mu\text{g}$ ) 加入 180  $\mu\text{l}$  体积分数 1% 牛血清白蛋白配制成 10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ , 用时以无血清 DMEM 稀释至所需质量浓度。

**1.2.3 MTT 法检测不同质量浓度 IL-1 $\beta$  对兔 RPE 细胞增生的影响** 选取第 3~4 代对数生长期 RPE 细胞以  $2 \times 10^4/\text{ml}$  密度接种于 96 孔培养板, 每孔 200  $\mu\text{l}$ , 24 h 后更换为无血清 DMEM 继续培养 24 h。对照组加入无血清 DMEM, 实验组分别加入 2.5、5.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{L}$  IL-1 $\beta$ 。分别于培养后 24、48 和 72 h, 每孔加入 20  $\mu\text{l}$  MTT, 37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 4 h。倒置显微镜下见细胞内生成大量颗粒、针状甲瓞结晶者为活细胞。弃培养液, 每孔加入质量分数 10% 十二烷基硫酸钠 200  $\mu\text{l}$ , 待甲瓞结晶完全溶解后, 测定 570 nm 波长处各孔吸光度(A)值。每组设 5 个复孔, 实验重复 3 次, 计算细胞增生率。细胞增生率 = [(实验组平均 A 值 - 对照组平均 A 值) / 对照组平均 A 值]  $\times 100\%$ 。

**1.2.4 MTT 法检测不同药物对 IL-1 $\beta$  诱导兔 RPE 细胞增生的抑制作用** 对照组细胞中加入 IL-1 $\beta$  (根据 1.2.3 步骤选出最佳作用质量浓度), 实验组加入 IL-1 $\beta$  和药物(姜黄素终质量浓度分别为 5、10、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 丹参单体终质量浓度分别为 5、10、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 苦参碱终质量浓度分别为 100、200、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 其余步骤同 1.2.3 前, 计算细胞抑制率。细胞抑制率 = [(对照组平均 A 值 - 实验组平均 A 值) / 对照组平均 A 值]  $\times 100\%$ 。

### 1.3 统计学方法

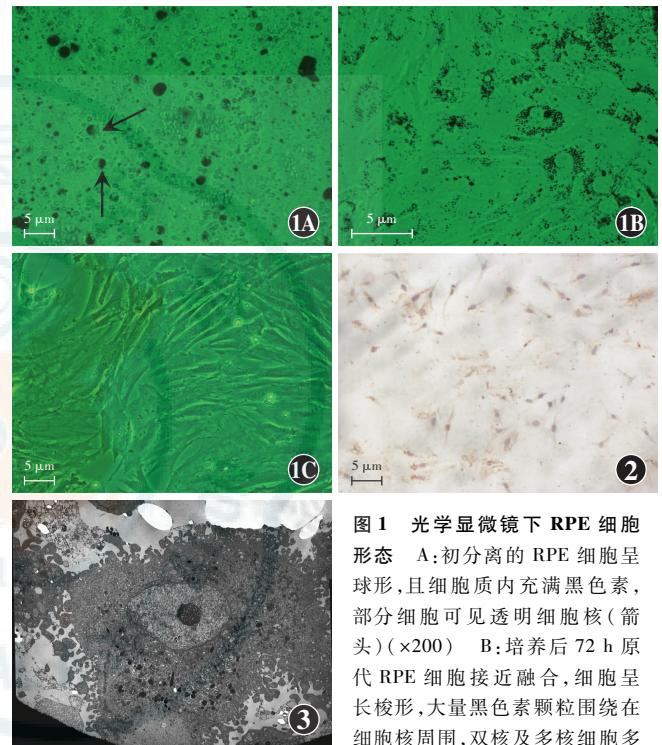
采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标数据经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 经 Levene 检验方差齐。采用两因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。通过线性回归分析计算 3 种药物作用于细胞不同时间后达半数抑制率 ( $\text{IC}_{50}$ ) 所需剂量。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 兔 RPE 细胞的主要特征及鉴定

初分离的兔 RPE 细胞呈球形, 多数细胞中充满黑色素, 少数细胞可见中央透明细胞核(图 1A)。细胞于培养后 48~72 h 贴壁, 培养后 72 h 细胞伸出伪足, 呈梭形、三角形或不规则形, 培养后 7 d 接近融合, 呈长梭形, 大量黑色素颗粒围绕在细胞核周围, 双核细胞多见(图 1B)。随传代次数的增加, 细胞内黑色素颗粒逐渐减少, 至第 4 代细胞色素颗粒明显减少, 形态更加

狭长, 排列紧密, 呈拉网状分布(图 1C)。免疫细胞化学染色结果显示, 细胞角蛋白(AE1/AE3)在细胞质呈阳性表达, 细胞核周围色素颗粒染色为棕黑色(图 2)。透射电子显微镜显示, 细胞顶端有大量长短不一的微绒毛, 细胞核及核仁清晰可见, 核周细胞质内可见大量大小不一, 呈椭圆形、圆形或杆状的黑色素颗粒, 细胞间可见连接复合体(图 3)。



**图 1 光学显微镜下 RPE 细胞形态** A:初分离的 RPE 细胞呈球形, 且细胞质内充满黑色素, 部分细胞可见透明细胞核(箭头)( $\times 200$ ) B:培养后 72 h 原代 RPE 细胞接近融合, 细胞呈长梭形, 大量黑色素颗粒围绕在细胞核周围, 双核及多核细胞多见( $\times 400$ ) C:第 4 代 RPE 细胞的细胞质内黑色素颗粒明显减少, 细胞形态更加狭长, 呈拉网状分布( $\times 200$ ) **图 2 RPE 细胞的细胞角蛋白免疫组织化学染色(DAB  $\times 200$ )** 细胞角蛋白表达呈阳性, 细胞质呈棕黄色染色, 细胞核周围可见棕黑色色素颗粒 **图 3 RPE 细胞透射电子显微镜下观察( $\times 2500$ )** 细胞顶端有大量长短不一的微绒毛, 细胞核及核仁清晰可见, 核周细胞质内可见大量呈椭圆形、圆形或杆状大小不一的黑色素颗粒, 细胞间可见紧密连接

### 2.2 不同质量浓度 IL-1 $\beta$ 对兔 RPE 细胞增生的影响

与对照组相比, 各质量浓度 IL-1 $\beta$  组细胞生长速度加快, 融合时间缩短。各质量浓度 IL-1 $\beta$  组培养后 24、48、72 h 细胞增生率总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{时间}} = 30.33, P = 0.00; F_{\text{浓度}} = 9.37, P = 0.00$ ); 各组内随着培养时间的延长, 细胞增生率升高, 组内相邻培养时间点间细胞增生率比较, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。10  $\mu\text{g}/\text{L}$  IL-1 $\beta$  组细胞增生率达峰值; 同一培养时间点中相邻质量浓度 IL-1 $\beta$  组间细胞增生率比较, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ) (表 1)。



**表 1 各质量浓度 IL-1β 组 RPE 细胞培养后不同时间点细胞增生率 (%)**

组别	培养后不同时间点细胞增生率		
	24 h	48 h	72 h
2.5 μg/L IL-1β 组	8.47±0.28	20.24±4.16 <sup>a</sup>	30.48±1.80 <sup>ab</sup>
5.0 μg/L IL-1β 组	20.12±6.14 <sup>c</sup>	30.00±1.95 <sup>ac</sup>	41.34±3.54 <sup>abc</sup>
10.0 μg/L IL-1β 组	27.18±2.90 <sup>cd</sup>	38.57±2.66 <sup>acd</sup>	45.50±2.13 <sup>abcd</sup>
20.0 μg/L IL-1β 组	21.20±2.00 <sup>e</sup>	32.86±1.20 <sup>ae</sup>	39.72±1.68 <sup>ae</sup>

注:  $F_{\text{时间}} = 30.33, P = 0.00; F_{\text{浓度}} = 9.37, P = 0.00; F_{\text{交互作用}} = 193.24, P = 0.00$ . 与组内培养后 24 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与组内培养后 48 h 值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与同一时间点 2.5 μg/L IL-1β 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与同一时间点 5.0 μg/L IL-1β 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与同一时间点 10.0 μg/L IL-1β 组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IL: 白细胞介素; RPE: 视网膜色素上皮

### 2.3 3 种药物对 IL-1β 诱导兔 RPE 细胞增生的抑制作用比较

对照组细胞生长迅速, 培养 24 h 后基本达到融合, 各药物组细胞生长缓慢, 排列稀疏。不同质量浓度姜黄素、丹参单体和苦参碱不同培养时间点细胞抑制率总体比较差异均有统计学意义 (姜黄素:  $F_{\text{时间}} = 128.75, P = 0.00; F_{\text{浓度}} = 334.05, P = 0.00$ . 丹参单体:  $F_{\text{时间}} = 39.32, P = 0.00; F_{\text{浓度}} = 165.57, P = 0.00$ . 苦参碱:  $F_{\text{时间}} = 267.76, P = 0.00; F_{\text{浓度}} = 912.34, P = 0.00$ )。各药物对 RPE 细胞增生的抑制率均呈明显的剂量和时间依赖性, 组内相邻培养时间点间、相邻质量浓度药物组间细胞抑制率的比较, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 2~4)。培养后 24、48 及 72 h, 姜黄素的 IC<sub>50</sub> 分别为 26.77、19.01 和 9.45 μg/ml, 丹参单体的 IC<sub>50</sub> 分别为 33.72、23.47 和 12.56 μg/ml, 苦参碱的 IC<sub>50</sub> 分别为 570.96、352.25 和 97.50 μg/ml (表 5)。

**表 2 不同质量浓度姜黄素对 IL-1β 诱导 RPE 细胞增生的抑制率 (%)**

组别	样本量	不同培养时间点细胞抑制率		
		24 h	48 h	72 h
5 μg/ml 姜黄素组	3	12.62±0.97	25.43±3.32 <sup>a</sup>	36.80±6.14 <sup>ab</sup>
10 μg/ml 姜黄素组	3	28.28±2.81 <sup>c</sup>	38.48±2.10 <sup>ac</sup>	49.27±1.59 <sup>abc</sup>
20 μg/ml 姜黄素组	3	40.09±1.64 <sup>d</sup>	50.52±4.06 <sup>ad</sup>	67.36±3.44 <sup>abd</sup>

注:  $F_{\text{时间}} = 128.75, P = 0.00; F_{\text{浓度}} = 334.05, P = 0.00; F_{\text{交互作用}} = 47.07, P = 0.00$ . 与组内 24 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与组内 48 h 值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与同一培养时间点 5 μg/ml 姜黄素组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与同一培养时间点 10 μg/ml 姜黄素组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IL: 白细胞介素; RPE: 视网膜色素上皮

**表 3 不同质量浓度丹参单体对 IL-1β 诱导 RPE 细胞增生的抑制率 (%)**

组别	样本量	不同培养时间点细胞抑制率		
		24 h	48 h	72 h
5 μg/ml 丹参单体组	3	12.28±1.44	20.81±5.20 <sup>a</sup>	33.35±4.06 <sup>ab</sup>
10 μg/ml 丹参单体组	3	20.39±2.60 <sup>c</sup>	27.55±2.45 <sup>ac</sup>	35.55±2.85 <sup>abc</sup>
20 μg/ml 丹参单体组	3	37.47±1.43 <sup>d</sup>	48.56±2.84 <sup>ad</sup>	54.05±5.55 <sup>abd</sup>

注:  $F_{\text{时间}} = 39.32, P = 0.00; F_{\text{浓度}} = 165.57, P = 0.00; F_{\text{交互作用}} = 54.70, P = 0.00$ . 与组内 24 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与组内 48 h 值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与同一培养时间点 5 μg/ml 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与同一培养时间点 10 μg/ml 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IL: 白细胞介素; RPE: 视网膜色素上皮

**表 4 不同质量浓度苦参碱对 IL-1β 诱导 RPE 细胞增生的抑制率 (%)**

组别	样本量	不同培养时间点细胞抑制率		
		24 h	48 h	72 h
100 μg/ml 苦参碱组	3	12.07±2.95	20.57±2.65 <sup>a</sup>	33.91±2.68 <sup>ab</sup>
200 μg/ml 苦参碱组	3	25.28±2.52 <sup>c</sup>	33.95±1.63 <sup>ac</sup>	48.07±3.95 <sup>abc</sup>
400 μg/ml 苦参碱组	3	40.13±2.59 <sup>d</sup>	51.12±2.73 <sup>ad</sup>	60.80±6.14 <sup>abd</sup>

注:  $F_{\text{时间}} = 267.76, P = 0.00; F_{\text{浓度}} = 912.34, P = 0.00; F_{\text{交互作用}} = 57.25, P = 0.00$ . 与组内 24 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与组内 48 h 值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与同一培养时间点 100 μg/ml 苦参碱组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与同一培养时间点 200 μg/ml 苦参碱组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IL: 白细胞介素; RPE: 视网膜色素上皮

**表 5 3 种药物培养不同时间点 IC<sub>50</sub> (μg/ml)**

组别	不同培养时间点 IC <sub>50</sub>		
	24 h	48 h	72 h
姜黄素组	26.77	33.72	549.70
丹参单体组	19.01	23.47	384.16
苦参碱组	9.45	18.37	227.24

注: IC<sub>50</sub>: 半数抑制率

### 3 讨论

IL-1β 是 PVR 早期主要的炎症因子, 在 PVR 患者玻璃体<sup>[6]</sup>、视网膜下液<sup>[7]</sup>、PVR 动物模型视网膜增生膜中<sup>[8]</sup>均可检测到该因子的高表达。IL-1β 可以刺激体外培养的牛 RPE 细胞增生<sup>[9]</sup>, 并表达 IL-6、IL-8、单核细胞趋化因子-1、细胞间黏附分子 (intercellular cell adhesion molecule, ICAM)-1、基质金属蛋白酶类, 还可以促进 RPE 细胞内胶原蛋白合成<sup>[10-13]</sup>。这些因子可以促进 RPE 细胞的增生、移行、分化和细胞外基质的合成, 促进 PVR 的发生。因此, 本研究中将 IL-1β 作用于体外培养的兔 RPE 细胞, 模拟 PVR 早期炎症阶段, 观察其对 RPE 细胞增生的影响和药物的抗增生作用。

本研究结果显示, 不同质量浓度 IL-1β 均可以明



显刺激 RPE 细胞增生,且 IL-1 $\beta$  质量浓度为 2.5 ~ 10.0  $\mu\text{g/L}$  时,随质量浓度的升高,作用逐渐增强,并于 10.0  $\mu\text{g/L}$  时达峰值,20.0  $\mu\text{g/L}$  时作用有所减弱,提示 IL-1 $\beta$  的作用可能存在阈值,超过此质量浓度后 IL-1 $\beta$  对细胞的促增生作用会减弱,甚至产生一定的抑制作用。同时本研究中结果显示,IL-1 $\beta$  的促增生能力与作用时间呈正相关。因此,2.5 ~ 10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  可以促进 RPE 细胞增生,其作用具有时间依赖性、剂量依赖性,其中 10.0  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  作用 72 h 后对 RPE 细胞的促增生作用最为显著。

近年来,临床防治 PVR 的药物较多,主要包括玻璃体腔注射曲安奈德<sup>[14]</sup>、地塞米松缓释剂<sup>[15-16]</sup>、5-氟尿嘧啶和低分子肝素<sup>[17]</sup>、道诺霉素<sup>[18]</sup>以及口服泼尼松<sup>[19]</sup>、13 顺式维甲酸<sup>[20]</sup>等。这些药物的治疗虽取得一定疗效,但也存在一些争议。Kuo 等<sup>[21]</sup>对 30 只 PVR 模型兔眼玻璃体腔注射地塞米松缓释剂,结果显示药物可降低炎症因子表达,但不能减轻 PVR 程度。Khan 等<sup>[22]</sup>对 2000—2014 年数篇关于以上药物的 PVR 临床研究进行分析,发现药物对于 PVR 的疗效并不确切。Shi 等<sup>[23]</sup>对 2014 年 7 月前有关糖皮质激素类药物防治 PVR 的研究进行分析,结果显示用药后 PVR B 级或 B 级以下的发病率明显降低。

既往姜黄素、丹参单体及苦参碱的相关研究主要集中在药物的促凋亡、抗纤维化、抗炎作用,其中姜黄素抗肿瘤作用显著<sup>[24-26]</sup>。3 种药物在眼科领域研究少见。有研究证实,丹参对体外培养的人晶状体上皮细胞具有明显的抗氧化损伤作用<sup>[27]</sup>。苦参碱可以抑制体外培养的兔晶状体上皮细胞或人翼状胬肉成纤维细胞增生<sup>[28-29]</sup>,也可抑制人视网膜母细胞瘤细胞生长并诱导其凋亡<sup>[30]</sup>。姜黄素可抑制体外培养的牛晶状体上皮细胞增生<sup>[31]</sup>,并通过细胞核和细胞质 2 种途径诱导其凋亡<sup>[32]</sup>;姜黄素可抑制体外培养的兔 RPE 细胞增生并诱导其凋亡<sup>[2]</sup>,也可显著抑制 IL-1 $\beta$  诱导的人 RPE 细胞分泌 IL-8 和可溶性 ICAM-1<sup>[33]</sup>;此外,姜黄素还可抑制翼状胬肉成纤维细胞增生<sup>[34]</sup>。目前,关于 3 种中药抑制 RPE 细胞增生的机制研究较少。安建斌等<sup>[2]</sup>研究了姜黄素对体外培养的兔 RPE 细胞的抑制作用和机制,发现姜黄素可将细胞周期阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,也可通过调节凋亡相关基因 P53 和 Bcl-2 的表达来诱导细胞凋亡,从而达到抗增生效果。有关丹参单体和苦参碱的抗 RPE 细胞增生的机制目前尚无报道,根据相关研究提供的信息,我们推测可能与诱导细胞凋亡等有关<sup>[35-36]</sup>,有待进一步研究证实。

本研究中发现,不同药物作用后细胞数量明显减

少,细胞增生受到明显抑制。3 种药物的抗增生作用均呈剂量和时间依赖性,即药物质量浓度越大、作用时间越长,抗增生作用越明显。预实验中我们发现,姜黄素与丹参单体的抗增生作用效果较接近,而苦参碱的作用较弱,因此本研究中姜黄素与丹参单体选择相同质量浓度以便比较。20  $\mu\text{g/ml}$  姜黄素和丹参单体作用 72 h 后抑制率分别为 (67.36 $\pm$ 3.44)% 和 (54.05 $\pm$ 5.55)%,提示姜黄素对 RPE 细胞的抗增生作用较丹参单体强;而 400  $\mu\text{g/ml}$  苦参碱作用 72 h 后抑制率仅为 (60.80 $\pm$ 6.14)%。根据 IC<sub>50</sub> 判断抗增生效果由强到弱依次为姜黄素、丹参单体和苦参碱。

综上所述,IL-1 $\beta$  可促进 RPE 细胞增生,10  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  促增生作用最显著;姜黄素、丹参单体、苦参碱均可抑制 IL-1 $\beta$  诱导的 RPE 细胞增生,其抑制作用均呈时间和剂量依赖性,其中姜黄素抗增生作用最强。姜黄素、丹参单体、苦参碱有望成为临床防治早期 PVR 的新型天然药物。

## 参考文献

- [1] Machemer R, Norton EW. Experimental retinal detachment in the owl monkey. I. Methods of production and clinical picture [J]. Am J Ophthalmol, 1968, 66(3): 388-396.
- [2] 安建斌, 马景学, 高彦军, 等. 姜黄素和苏拉明抑制兔 RPE 细胞增生的对比研究[J]. 眼科研究, 2008, 26(7): 490-493. An JB, Ma JX, Gao YJ, et al. Inhibition effect of curcumin and suramin on proliferation of rabbit retinal pigment epithelial cells [J]. Chin Ophthalmic Res, 2008, 26(7): 490-493.
- [3] 高彦军, 马景学, 安建斌, 等. 丹参单体、三氟拉嗪对视网膜色素上皮细胞增殖抑制的研究[J]. 眼科新进展, 2011, 31(9): 820-823. Gao YJ, Ma JX, An JB, et al. Inhibition effect of salvia miltiorrhiza and trifluoperazine on proliferation of retinal pigment epithelial cells [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2011, 31(9): 820-823.
- [4] 王建民, 马景学, 高彦军, 等. 苦参碱和氧化苦参碱对体外培养兔视网膜色素上皮细胞增殖的影响[J]. 河北医科大学学报, 2011, 32(2): 166-169. Wang JM, Ma JX, Gao YJ, et al. The effect of matrine and oxymatrine on proliferation of rabbit retinal pigment epithelial cells [J]. J Hebei Med Univ, 2011, 32(2): 166-169.
- [5] 刘丽娅, 马景学, 高彦军, 等. 兔眼与猪视网膜色素上皮细胞分离及培养方法的对比[J]. 眼科研究, 2010, 28(1): 11-14. DOI: 10.3969/j. issn. 1003-0808. 2010. 01. 004. Liu LY, Ma JX, Gao YJ, et al. Comparison of *in vitro* isolation and culture of retinal pigment epithelial cells in rabbit eye and pig eye [J]. Chin Ophthalmic Res, 2010, 28(1): 11-14. DOI: 10.3969/j. issn. 1003-0808. 2010. 01. 004.
- [6] El-Ghrably IA, Dua HS, Orr GM, et al. Intravitreal invading cells contribute to vitreal cytokine milieu in proliferative vitreoretinopathy [J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85(4): 461-470.
- [7] Limb GA, Little BC, Meager A, et al. Cytokines in proliferative vitreoretinopathy [J]. Eye (Lond), 1991, 5(Pt 6): 686-693. DOI: 10.1038/eye. 1991. 126.
- [8] 石一宁, 惠延年, 王文勇, 等. 巨噬细胞诱发的增殖性玻璃体视网膜病变视网膜内的炎症细胞因子 [J]. 临床眼科杂志, 1998, 6(3): 166-168.
- [9] Karthikeyan B, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, et al. Gold

- nanoparticles downregulate VEGF-and IL-1 $\beta$ -induced cell proliferation through Src kinase in retinal pigment epithelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 91(5): 769-778. DOI:10.1016/j.exer.2010.09.003.
- [10] Ling D, Liu B, Jawad S, et al. The tellurium redox immunomodulating compound AS101 inhibits IL-1 $\beta$ -activated inflammation in the human retinal pigment epithelium [J]. *Br J Ophthalmol*, 2013, 97(7): 934-938. DOI:10.1136/bjophthalmol-2012-301962.
- [11] Qin S, Ni M, De Vries GW. Implication of S-adenosylhomocysteine hydrolase in inhibition of TNF-alpha-and IL-1beta-induced expression of inflammatory mediators by AICAR in RPE cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(3): 1274-1281. DOI:10.1167/iiov.07-1109.
- [12] Xie M, Hu A, Luo Y, et al. Interleukin-4 and melatonin ameliorate high glucose and interleukin-1 $\beta$  stimulated inflammatory reaction in human retinal endothelial cells and retinal pigment epithelial cells [J]. *Mol Vis*, 2014, 20: 921-928.
- [13] 冯学峰, 惠延年, 王雨生. IL-1 $\beta$  对人视网膜色素上皮细胞胶原合成的作用 [J]. 第四军医大学学报, 1999, 20(8): 656-658.  
Feng XF, Hui YN, Wang YS. Effects of IL-1 $\beta$  on the collagen synthesis in human retinal pigment epithelial cells [J]. *J Fourth Military Med Univ*, 1999, 20(8): 656-658.
- [14] Chen W, Chen H, Hou P, et al. Midterm results of low-dose intravitreal triamcinolone as adjunctive treatment for proliferative vitreoretinopathy [J]. *Retina*, 2011, 31(6): 1137-1142. DOI:10.1097/IAE.0b013e3181fe5427.
- [15] Reibaldi M, Russo A, Longo A, et al. Rhegmatogenous retinal detachment with a high risk of proliferative vitreoretinopathy treated with episcleral surgery and an intravitreal dexamethasone 0.7-mg implant [J]. *Ophthalmology*, 2013, 4(1): 79-83. DOI:10.1159/000351176.
- [16] Banerjee PJ, Bunce C, Charteris DG. Ozurdex (a slow-release dexamethasone implant) in proliferative vitreoretinopathy: study protocol for a randomised controlled trial [J/OL]. *Trials*, 2013, 14: 358 [2015-12-11]. <http://trialsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6215-14-358>. DOI:10.1186/1745-6215-14-358.
- [17] Sundaram V, Barsam A, Virgili G. Intravitreal low molecular weight heparin and 5-Fluorouracil for the prevention of proliferative vitreoretinopathy following retinal reattachment surgery [J/OL]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, (1): CD006421 [2015-10-10]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD006421.pub3/pdf>. DOI:10.1002/14651858.CD006421.pub3.
- [18] Kumar A, Nainiwal S, Choudhary I, et al. Role of daunorubicin in inhibiting proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery [J]. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2002, 30(5): 348-351.
- [19] Koerner F, Koerner-Stiefbold U, Garweg JG. Systemic corticosteroids reduce the risk of cellophane membranes after retinal detachment surgery: a prospective randomized placebo-controlled double-blind clinical trial [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 250(7): 981-987. DOI:10.1007/s00417-011-1919-y.
- [20] Chang YC, Hu DN, Wu WC. Effect of oral 13-cis-retinoic acid treatment on postoperative clinical outcome of eyes with proliferative vitreoretinopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 2008, 146(3): 440-446. DOI:10.1016/j.ajo.2008.05.002.
- [21] Kuo HK, Chen YH, Wu PC, et al. The effects of Ozurdex® (Dexamethasone intravitreal implant) on experimental proliferative vitreoretinopathy [J]. *Ophthalmologica*, 2015, 233(3-4): 198-203. DOI:10.1159/000371901.
- [22] Khan MA, Brady CJ, Kaiser RS. Clinical management of proliferative vitreoretinopathy: an update [J]. *Retina*, 2015, 35(2): 165-175. DOI:10.1097/IAE.0000000000000447.
- [23] Shi H, Guo T, Liu PC, et al. Steroids as an adjunct for reducing the incidence of proliferative vitreoretinopathy after rhegmatogenous retinal detachment surgery: a systematic review and meta-analysis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 1393-1400. DOI:10.2147/DDDT.S80983.
- [24] Liu TY, Tan ZJ, Jiang L, et al. Curcumin induces apoptosis in gallbladder carcinoma cell line GBC-SD cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1): 64. DOI:10.1186/1475-2867-13-64.
- [25] Nagy LI, Fehér LZ, Szebeni GJ, et al. Curcumin and its analogue induce apoptosis in leukemia cells and have additive effects with bortezomib in cellular and xenograft models [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 968981 [2016-01-17]. <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/968981/>. DOI:10.1155/2015/968981.
- [26] Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction [J]. *FEBS Lett*, 2002, 512(1-3): 334-340.
- [27] 崔璟琳, 高维奇, 张红, 等. 丹参抗晶状体上皮细胞 DNA 氧化损伤的研究 [J]. *眼科研究*, 2007, 25(9): 671-673.  
Cui JL, Gao WQ, Zhang H, et al. Study on Tan-shen against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage of lens epithelial cells [J]. *Chin Ophthalmic Res*, 2007, 25(9): 671-673.
- [28] 王智, 何湘珍, 彭辉灿, 等. 苦参碱对体外培养的兔晶状体上皮细胞的影响 [J]. *眼科新进展*, 2007, 27(5): 353-355.  
Wang Z, He XZ, Peng HC, et al. Effect of matrine on rabbit lens epithelial cells cultured *in vitro* [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2007, 27(5): 353-355.
- [29] 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 Traditional Chin Ophthalmol*, 2007, 17(2): 85-88.
- [30] 喻巍, 李彬, 任若瑾, 等. 苦参碱对人视网膜母细胞瘤细胞生长与端粒酶活性影响的实验研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42(7): 594-599.  
Yu W, Li B, Ren RJ, et al. The effects of matrine on cell proliferation and telomerase activity in retinoblastoma cells *in vitro* [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2006, 42(7): 594-599.
- [31] 胡艳红, 祁明信, 黄秀榕, 等. 姜黄素对晶状体上皮细胞增殖的抑制作用 [J]. *眼科研究*, 2006, 24(2): 122-124.  
Hu YH, Qi MX, Huang XR, et al. Inhibitory effect of curcumin on proliferation of lens epithelial cells [J]. *Chin Ophthalmic Res*, 2006, 24(2): 122-124.
- [32] 黄秀榕, 祁明信, 康可人. 姜黄素诱导牛晶状体上皮细胞凋亡的机制 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42(7): 649-653.  
Huang XR, Qi MX, Kang KR. Apoptosis of lens epithelial cell induced by curcumin and its mechanism [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2006, 42(7): 649-653.
- [33] 龚凌, 姜德咏. 姜黄素对 IL-1 $\beta$  诱导视网膜色素上皮细胞分泌 IL-8 和 sICAM-1 的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2006, 6(6): 1300-1301.  
Gong L, Jiang DY. Effect of curcumin on rhIL-1 $\beta$ -induced IL-8 and sICAM-1 secretion in RPE cells [J]. *Int J Ophthalmol*, 2006, 6(6): 1300-1301.
- [34] 边芳, 张明昌. 姜黄素抑制翼状胬肉成纤维细胞增生的研究 [J]. *临床眼科杂志*, 2005, 13(3): 198-201.  
Bian F, Zhang MC. Inhibition effect of curcumin on proliferation of human pterygium fibroblasts [J]. *J Clin Ophthalmol*, 2005, 13(3): 198-201.
- [35] 马玲娣, 张彦, 何於娟, 等. 苦参碱对小鼠 H22 肝癌细胞凋亡作用的实验研究 [J]. *肿瘤*, 2007, 27(8): 602-606.  
Ma LD, Zhang Y, He YJ, et al. Matrine induced apoptosis of murine H22 hepatocarcinoma cells [J]. *TUMOR*, 2007, 27(8): 602-606.
- [36] 张晓岚, 姜慧卿, 刘丽, 等. 丹参单体 IH764-3 诱导肝星状细胞凋亡 [J]. *中华内科杂志*, 2002, 41(9): 616-617.  
Zhang XL, Jiang HQ, Liu L, et al. Salvia miltiorrhiza IH764-3 induce of apoptosis of Hepatic stellate cell [J]. *Chin J Gastroenterology*, 2002, 41(9): 616-617.

(收稿日期:2016-03-01)

(本文编辑:刘艳 张宇)