

二甲基亚砷对体外培养眼组织细胞的毒性作用

赵春晖 兰碧菲 侯江平 程凌云

【摘要】 背景 二甲基亚砷(DMSO)是常用的药物助溶剂,但 DMSO 体积分数较高时对细胞有毒性,可能影响对受试药物的正确评价,所以确定不同眼组织细胞对 DMSO 的敏感性十分重要。目的 探讨 DMSO 对体外培养的多种眼组织细胞的最小毒性体积分数,为眼部药物的体外筛选提供依据。方法 采集青紫蓝兔的视网膜色素上皮(RPE)细胞进行培养,并利用免疫组织化学法进行鉴定。分别对人视网膜色素上皮细胞株(ARPE19)、巩膜成纤维细胞(S75-Fron)、Müller 细胞(MIO-M1)、人晶状体上皮细胞(HLEC)、人眼葡萄膜黑色素瘤细胞(OCM-1)、人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)进行体外培养。取 160 μ l DMSO 溶液和 9.84 ml 含体积分数 2% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 或 DMEM/F12 或 DMEM 培养液配制体积分数分别为 1.6%、1.0%、0.8%、0.4%、0.2% 和 0.1% DMSO 的 RPMI1640、DMEM/F12 和 DMEM 培养液,在培养的各种细胞中分别加入不同体积分数的 DMSO 培养液作用 96 h,采用 MTS 法检测各组细胞的吸光度(A)值。结果 培养的兔原代 RPE 细胞对细胞角蛋白(CK)和 HMB45 呈黄绿色荧光,细胞质和细胞核内 S100 阳性反应呈红色荧光。随着 DMSO 体积分数的增加,各细胞活性(A 值)逐渐降低,随着 DMSO 体积分数的增加,ARPE19、S75-Fron、HLEC、OCM-1、HUVEC 和原代 RPE 细胞活性(A 值)均明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),当 DMSO 体积分数 $\geq 0.8\%$ 时,RPE 细胞活性均明显低于空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),但 MIO-M1 细胞株活性的差异无统计学意义($F = 0.830, P = 0.547$)。DMSO 对 ARPE19、HUVEC、HELA、HLEC、MIO-M1、OCM-1、原代 RPE 细胞和 S75-Fron 细胞最低有毒体积分数分别为 0.8%、0.1%、0.8%、 $> 1.6\%$ 、 $> 1.6\%$ 、0.2%、0.2% 和 0.2%,HUVEC 对 DMSO 的毒性最敏感,在 0.1% DMSO 情况下即显示出毒性($P = 0.02$),而 MIO-M1 细胞在 1.6% DMSO 的情况下仍未显示出毒性作用($P = 0.39$)。HUVEC 和原代 RPE 细胞活性随 DMSO 体积分数的增加而下降,S75-Fron 细胞活性在 DMSO 体积分数为 0.1% 时开始下降,之后虽然 DMSO 体积分数增加,但细胞活性保持平稳,当 DMSO 体积分数增至 1.6% 时,S75-Fron 细胞活性进一步下降,MIO-M1 细胞活性在不同体积分数的 DMSO 组无明显变化。结论 DMSO 在体外实验中的细胞毒性随体积分数的增大而增强,在达到助溶效果的情况下应选用最小体积分数的 DMSO,同时设与样品中 DMSO 相同体积分数的 DMSO 对照。

【关键词】 二甲基亚砷; 细胞毒性; 眼组织细胞; 药物筛选

Cytotoxicity of dimethyl sulphoxide on ocular cells *in vitro* Zhao Chunhui, Lan Bifei, Hou Jiangping, Cheng Lingyun. Institute of Ocular Pharmacology, Eye Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China
Corresponding author: Cheng Lingyun, Email: lingyunc@hotmail.com

【Abstract】 **Background** Dimethyl sulfoxide(DMSO) is a commonly used adjuvant to promote testing drug solubility to prepare multi-levels testing drug concentrations. DMSO is cell type-dependent cytotoxic and its toxicity can interfere the testing drug evaluation. Determining its safe concentration on commonly used cell types is important for ocular drug development. **Objective** This study was to determine the minimal toxic concentration of DMSO for *in vitro* ocular cell lines in a simulated drug screening setting. **Methods** Retinal pigment epithelial (RPE) cells were isolated from one pigmented rabbit and primarily cultured. Human RPE cell strain (ARPE19), scleral fibroblasts line (S75-Fron), human Müller cell line (MIO-M1), human lens epithelial cell line (HLEC), human choroidal melanoma cell line (OCM-1), human umbilical endothelial cell (HUVEC) and human HeLa cell line (HELA) were cultured. Different concentrations of DMSO (1.6%, 1.0%, 0.8%, 0.4%, 0.2% and 0.1%) were prepared with

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.03.006

基金项目:国家自然科学基金项目(31271022)

作者单位:325027 温州医科大学眼视光学院眼科药物研究所

通信作者:程凌云, Email: lingyunc@hotmail.com

160 μ l DMSO solution and 9.84 ml RPMI1640 (or DMEM/F12 or DMEM) containing 2% fetal bovine serum. Different concentrations of DMSO were added in medium for 96 hours, and the viability (absorbance) of the cells was detected using MTS to evaluate the cytotoxicity of DMSO. **Results** Rabbit primary RPE cells showed the yellow-green fluorescence for cytokeratin(CK) and HMB45 red fluorescence for S100. The viability of the cells was gradually declined as the increase of DMSO dose, showing significant differences in ARPE19, S75-Fron, HLEC, OCM-1, HUVEC and primary RPE cells (all at $P < 0.05$), and when DMSO concentrations were $\geq 0.8\%$, the cell viabilities were significantly lower. But no significant difference was found in MIO-M1 cells among different doses of DMSO ($F = 0.830, P = 0.547$). The minimal toxic concentration of DMSO for ARPE19, HUVEC, HELA, HLEC, MIO-M1, OCM-1, primary RPE cells and S75-Fron was 0.8%, 0.1%, 0.8%, $>1.6\%$, $>1.6\%$, 0.2%, 0.2%, 0.2%, respectively, and HUVEC was more sensitive to the cytotoxicity of DMSO ($P = 0.02$), and MIO-M1 was the least sensitive to DMSO ($P = 0.39$). The viability of HUVEC and primary RPE cells went down with the increase of DMSO dose, and S75-Fron viability started to decline in 0.1% DMSO and then stabilize with the higher concentrations until 1.6% DMSO at which the viability showed further decline. **Conclusions** The tolerability of ocular cells *in vitro* to DMSO varies depending on the cell types. The minimal toxic concentration ranged from 0.1% to 1.6%. The result suggests that a concurrent DMSO control should be set up along with the testing compound.

[Key words] Dimethyl sulfoxide; Cytotoxicity; Ocular cells; Drug screening

眼组织细胞的体外培养是进行药物筛选的重要步骤,也是进入临床前期药物筛选经济而有效的手段。然而,离体培养的细胞与体内细胞有诸多不同之处,如离体培养的细胞对接触更加敏感^[1],此外药物溶解不完全或样品中有微小药物颗粒时与细胞接触可能会引发细胞毒性^[2]。临床工作中发现,眼后节疾病常为慢性、顽固性疾病,因此用长效缓释药物疗效更好,而此类药物,如曲安奈德、雷帕霉素、他克莫司和多数非甾体类抗炎药的水溶性较差^[3-6]。在开发新药和改良现有药物剂型时,均需要使用助溶剂充分溶解药物,以便进行体外细胞的筛选实验。助溶剂应满足对样品的溶解效果好、与培养液有良好的互溶性、在一定的体积分数内对实验细胞无明显毒性等前提条件。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)是常用的脂溶性药物的有机助溶剂^[7],也是一种渗透性保护剂,能降低细胞的冰点,减少冰晶在细胞内的形成,减轻自由基对细胞的损害,改善生物膜对电解质、药物、毒物和代谢产物的通透性,体积分数 10% DMSO 可用于细胞的超低温快速冷冻,但与细胞的接触时间必须很短,否则细胞活性明显下降^[8],对生物体有毒性作用^[9]。眼组织细胞在增生、分化等方面均有别于其他体细胞,且眼部不同细胞间也各具特性^[10],目前关于 DMSO 对眼组织细胞体外生长影响的研究报道少见。本实验观察 DMSO 对体外培养的眼组织细胞生长和活力的影响,并分析 DMSO 的量效关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 清洁级青紫蓝灰兔 1 只[合格证

号:SCXK(浙)2006-0026],体质量 2.5 kg,由温州医科大学动物中心提供。本研究经温州医科大学伦理委员会批准,实验动物的使用遵循 ARVO 声明。

1.1.2 主要细胞 人视网膜色素上皮细胞株(human retinal pigment epithelium cell line, ARPE19)、人巩膜成纤维细胞株(scleral fibroblasts line, S75-Fron)、人晶状体上皮细胞株(human lens epithelial cell line, HLEC)、宫颈癌 HELA 细胞株(美国 ATCC 细胞库);人视网膜 Müller 细胞株(Müller cell line, MIO-M1)(英国伦敦大学眼科研究所 Gloria Astrid Limb 教授惠赠);人眼葡萄膜色素瘤细胞株(human choroidal melanoma cell line, OCM-1)(纽约眼耳鼻喉医院建立细胞系);兔原代视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞(自行分离);人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical endothelial cell, HUVEC)(温州医科大学吴胜洲教授惠赠)。

1.1.3 主要试剂 Hank 液、DMEM/F12、体积分数 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI1640(美国 Gibco 公司);抗细胞角蛋白(cytokeratin, CK)多克隆抗体(Z0622, 1:50)、兔抗 S100 蛋白多克隆抗体(IS504, 1:400)、山羊抗小鼠荧光二抗(F0479, 1:500)(丹麦 Dako 公司);兔抗黑色素 HMB45 单克隆抗体(bs-0051R, 1:75)(北京博奥森公司);TRITC 标记山羊抗小鼠荧光二抗(BA1089, 1:500)(武汉博士德公司);MTS(美国 Promega 公司);DMSO(美国 Sigma 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 兔原代 RPE 细胞的培养 采用过量麻醉法处死后无菌条件下摘除眼球,浸于体积分数 5% 聚维酮碘液中 5 min,用质量分数 0.9% 生理盐水浸泡清洗。

剪除眼球表面的疏松结缔组织,浸于含青霉素、链霉素的 Hank 液中 10 min。用巩膜穿刺刀于角膜缘后约 3 mm 处刺破眼球壁,环形剪开巩膜,去除前节眼组织,然后倒过眼杯,去除玻璃体。向眼杯中加入质量分数 0.25% 胰蛋白酶约 3 ml,置 37 °C 培养箱中进行组织消化约 1 h,用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液终止消化,光学显微镜下可见视网膜飘起。用视神经剪剪断视神经,去除视网膜组织,光学显微镜下小心刮除 RPE 层,移入 15 ml 离心管中,离心半径 13.5 cm,1 000 r/min 离心 5 min,去除上清,用含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养液重悬细胞,接种于培养瓶内 72 h,换 15% FBS 的培养液,细胞接近融合后按 1:3 传代,传代后换为 10% FBS 的培养液,建立兔原代 RPE 细胞。

1.2.2 免疫组织化学法鉴定 RPE 细胞 参照文献[11-13]的方法对培养细胞进行鉴定,所有步骤按照试剂盒说明进行,分别加入 CK、S100、HMB45 一抗和 FITC 或 TRITC 标记的二抗,加入 DAPI 工作液(1:200)后观察细胞质或细胞核内的染色情况。抗 CK 和 HMB45 抗体阳性反应呈黄绿色,位于细胞质内;抗 S-100 抗体阳性反应呈红色,位于细胞质或细胞核内,细胞核均呈蓝色。用 PBS 代替一抗为空白对照。

1.2.3 细胞爬片的培养 培养细胞爬片,去血清,PBS 洗 2 次,每次 2~3 min,用质量分数 4% 多聚甲醛室温下固定 10~20 min,去固定液,PBS 洗 3 次,每次 2~3 min;晾干或半干,体积分数 25% 甘油封片^[11-13]。

1.2.4 人眼部 8 种细胞株的体外培养 HLEC、ARPE-19 和兔原代 RPE 细胞的培养液为含 10% FBS 的 DMEM/F12 细胞培养液,OCM-1 细胞的培养液为含 10% FBS 的 RPMI1640 细胞培养液。HELA、HUVEC、S75-Fron 和 MIO-M1 细胞的培养液为含 10% FBS 的 DMEM 细胞培养液。培养液中加入 2 mmol/L L-谷氨酰胺及 50 mg/L 庆大霉素。细胞置于 37 °C、体积分数 5% CO₂、湿度 90% 的细胞培养箱中孵育,隔日换液,每日倒置相差显微镜下观察,待细胞融合时根据细胞量按 1:2 或 1:3 传代。

1.2.5 含不同体积分数 DMSO 培养液的配制 以 RPMI1640 培养液为例,配制含不同体积分数 DMSO 的培养液:分别取 160 μl DMSO 溶液和 9.84 ml 含 2% FBS 的 RPMI1640 培养液,加入至 15 ml 离心管中,充分混匀,用 0.22 μmol/L 微孔滤膜过滤除菌,配得含 1.6% DMSO 的 RPMI1640 溶液,然后对该溶液进行稀释,依次配制含 1.6%、0.8%、0.4%、0.2% 和 0.1% DMSO 的 RPMI1640 培养液。同法分别配制含 DMSO 的 DMEM/F12 培养液和 DMEM 培养液。

1.2.6 MTS 法测定细胞的增值值和活力 参照文献[14-17]的方法用 MTS 法测定细胞的增值情况。各种细胞在培养瓶内贴壁生长达 80%~90% 融合时将细胞接种到 96 孔板,细胞密度为 3 000 个/孔,每种细胞共设 7 个组,每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。培养后 24 h 移除培养液,分别加入 0.1%、0.2%、0.4%、0.8%、1.0% 和 1.6% 的 DMSO 培养液 200 μl,空白对照组加入 200 μl 不含 DMSO 的培养液进行培养^[16]。药物与细胞作用后 96 h,移除全部培养液,每孔重新加入 100 μl 培养液和 20 μl MTS 测试溶液,在 37 °C、5% CO₂、湿度 90% 的细胞培养箱中孵育 2.5 h,震荡摇匀,利用酶标仪测定波长 490 nm 处的吸光度(A_{490})值,通过 MTS 法测定其是否存在细胞毒性^[15,17]。以 MTS 检测活细胞的相对数量得出各体积分数 DMSO 组细胞的增值值(A),然后将其转换成最小二乘平均数(least squares means,LSMENS)。用 DMSO 处理后存活的细胞活性(A 值)与该细胞在空白对照组的细胞活性之比来表示该种细胞对 DMSO 的敏感性。

1.3 统计学方法

采用 SAS 9.3 统计学软件(NC 27513-2414,美国 SAS 公司)进行统计分析。细胞活性的数据资料的平均值取最小二乘平均(least square mean,LSM),各种细胞在不同剂量 DMSO 组的细胞活性(A 值)差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Duncan 检验。使用 GLM module 以细胞活性为因变量对细胞类型和 DMSO 浓度进行相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔原代 RPE 细胞的免疫荧光染色

培养细胞的细胞质中 CK 和 HMB45 呈黄绿色荧光,细胞质和细胞核内 S100 阳性呈红色荧光,细胞核均呈蓝色荧光。培养 RPE 细胞特有的上述 3 种抗体抗原反应均呈阳性,而阴性对照片呈阴性反应,证实分离的细胞为原代 RPE 细胞。

2.2 不同剂量 DMSO 组细胞株增值值和活性变化

随着 DMSO 体积分数的增加,ARPE19、S75-Fron、HLEC、OCM-1、HUVEC 和 RP-RPE 的细胞活性(A 值)下降,差异均有统计学意义($F = 19.210, 8.700, 2.700, 17.690, 82.850, 22.290$,均 $P < 0.05$),DMSO 体积分数为 0.8%、1.0% 和 1.6% 时,各类型细胞的增值值明显低于空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),但 MIO-M1(Müller 细胞)细胞株活性的差异无统计学意义($F = 0.830, P = 0.547$)(表 1)。

表 1 各体积分数 DMSO 组细胞的增值比较 (LSM, A₄₉₀)

DMSO 剂量	ARPE19	HUVEC	HELA	HLEC	MIO-M1	OCM-1	RP-RPE	S75-Fron
空白对照组	1.31	0.98	1.28	0.51	1.12	1.74	0.60	0.90
0.1%	1.29	0.91	1.16	0.53	1.12	1.67	0.57	0.83
0.2%	1.35	0.85	1.14	0.54	1.15	1.44	0.54	0.81
0.4%	1.22	0.77	1.17	0.58	1.15	1.38	0.54	0.79
0.8%	1.08 ^a	0.70 ^a	1.08 ^a	0.55	1.15	1.28 ^a	0.50 ^a	0.78 ^a
1.0%	1.05 ^a	0.64 ^a	0.99 ^a	0.55	1.07 ^a	1.22 ^a	0.46 ^a	0.79 ^a
1.6%	0.84 ^a	0.39 ^a	1.04 ^a	0.46 ^a	1.07 ^a	0.99 ^a	0.44 ^a	0.67 ^a
F	19.210	82.850	2.750	2.700	0.830	17.690	22.290	8.700
P	<0.001	<0.001	0.016	0.017	0.547	<0.001	<0.001	<0.001

注:与各自细胞的空白对照组比较,^aP<0.05(单因素方差分析, Duncan 检验) DMSO:二甲基亚砜;LSM:最小二乘均数;ARPE19:人视网膜色素上皮细胞株;HELA:宫颈癌细胞株;HUVEC:人脐周静脉血管内皮细胞;HLEC:人晶状体上皮细胞株;MIO-M1:人视网膜 Müller 细胞株;OCM-1:人眼葡萄膜色素瘤细胞株;RPE:视网膜色素上皮;S75-Fron:人巩膜成纤维细胞株

2.3 不同细胞对 DMSO 的敏感性

不同细胞对 DMSO 的敏感性不同,用 DMSO 处理的细胞活性(A 值)与该细胞在空白对照组的细胞活性之比来表示不同细胞对 DMSO 的敏感性。结果表明 HUVEC 对 DMSO 的毒性最敏感(DMSO 的最小毒性体积分数值最低),原代 RPE 细胞和 OCM-1 细胞次之, MIO-M1、HELA 和 HLEC 细胞对 DMSO 的毒性耐受性较强(图 1)。以 OCM-1 细胞为例,随着 DMSO 体积分数的增加,OCM-1 细胞的耐受性降低,细胞数量减少(图 2)。对低体积分数 DMSO 组和高体积分数 DMSO 组进行比较,空白对照组与 0.1% DMSO 组间细胞数量无明显变化,0.2% DMSO 组细胞数量较对照组稍有减少,1.6% DMSO 组细胞数量明显减少。DMSO 对各种细胞的最小有毒体积分数见表 2。

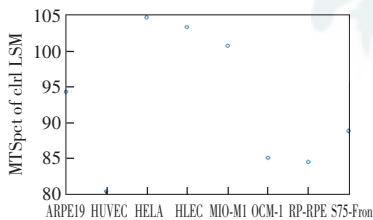


图 1 细胞活性和细胞类型的关系散点图 横坐标表示各种细胞类型,纵坐标表示各种细胞在 DMSO 作用下的细胞活性(A 值)占空白对照组细胞活性的百分数。数值越接近 100,代表该细胞对 DMSO 的毒性越不敏感,数值越小,代表该细胞对 DMSO 的毒性越敏感 ARPE19:人视网膜色素上皮细胞株;HUVEC:人脐周静脉血管内皮细胞;HELA:宫颈癌细胞株;HLEC:人晶状体上皮细胞株;MIO-M1:人视网膜 Müller 细胞株;OCM-1:人眼葡萄膜色素瘤细胞株;RP-RPE:原代 RPE 细胞;S75-Fron:人巩膜成纤维细胞株;LSM:最小二乘均数

HUVEC 组 DMSO 的有效毒性体积分数最小, HUVEC 和原代 RPE 细胞在 DMSO 体积分数为 0.1% 时活性下降,且随着 DMSO 体积分数的增加逐渐下降;而 S75-Fron 在 DMSO 体积分数为 0.2% 时细胞活性开

始下降,之后虽然 DMSO 体积分数逐渐增加,但细胞活性保持平稳,直到 DMSO 体积分数为 1.6% 时,细胞活性进一步下降,但其 DMSO 的最小有毒体积分数高于 HUVEC 和 RP-RPE 细胞组;MIO-M1 细胞活性在不同体积分数的 DMSO 作用下变化不大(图 3)。

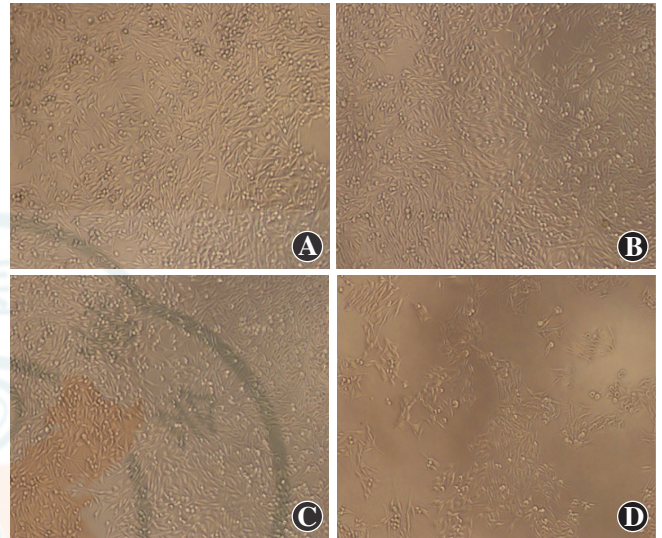


图 2 OCM-1 细胞对不同体积分数 DMSO 的耐受性(×100) 随着 DMSO 体积分数的增加,OCM-1 细胞的耐受性降低,细胞数量减少 A:空白对照组 B:0.1% DMSO 组 C:0.2% DMSO 组 D:1.6% DMSO 组

表 2 DMSO 对不同类型的细胞最小有毒浓度比较

细胞类型	最小有毒剂量(体积分数)	P
ARPE19	0.8%	0.00
HUVEC	0.1%	0.02
HELA	0.8%	0.02
HLEC	>1.6%	0.12
MIO-M1	>1.6%	0.39
OCM-1	0.2%	0.00
RP-RPE	0.2%	0.00
S75-Fron	0.2%	0.01

注:DMSO:二甲基亚砜;ARPE19:人视网膜色素上皮细胞株;HELA:宫颈癌细胞株;HUVEC:人脐周静脉血管内皮细胞;HLEC:人晶状体上皮细胞株;MIO-M1:人视网膜 Müller 细胞株;OCM-1:人眼葡萄膜色素瘤细胞株;RP-RPE:原代视网膜色素上皮;S75-Fron:人巩膜成纤维细胞株

3 讨论

DMSO 是比较理想的极性有机溶剂,易溶于水和其他有机溶剂,加入样品中的 DMSO 很难通过传统旋转挥发的方法除去,因此确定作用良好且无毒性的体积分数十分重要。一般认为,DMSO 在细胞培养液中的体积分数不超过 0.1% 时对细胞无毒性,但实际上不同细胞对 DMSO 的耐受不同。目前眼科药物的开发很活跃,许多新药都需要 DMSO 助溶以便加入细胞

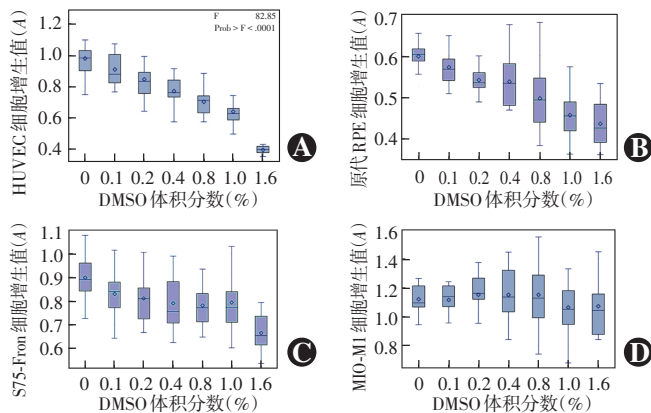


图3 不同类型的眼组织细胞对不同体积分数 DMSO 的反应
 A: HUVEC 活性随 DMSO 体积分数的增加而下降 B: 原代 RPE 细胞活性随 DMSO 体积分数的增加而下降 C: S75-Fron 细胞活性在 DMSO 体积分数为 0.1% 时开始下降, 之后虽然 DMSO 体积分数的增加, 但细胞活性保持平稳, 当 DMSO 体积分数为 1.6% 时, S75-Fron 细胞活性进一步下降 D: MIO-M1 细胞活性在不同体积分数的 DMSO 组无明显变化 HUVEC: 人脐周静脉血管内皮细胞; DMSO: 二甲亚砜; RPE: 视网膜色素上皮; S75-Fron: 人巩膜成纤维细胞株; MIO-M1: 人视网膜 Müller 细胞株

培养液进行离体实验。DMSO 对眼来源的细胞和细胞株的毒性研究甚少。本研究发现, 0.1% 的 DMSO 并非没有细胞毒性, 0.1% 的 DMSO 对 HUVEC 显示了毒性作用。兔原代 RPE 细胞和 OCM-1 细胞对 DMSO 也很敏感, 最小有毒体积分数均为 0.2%, 而 HLEC、MIO-M1 和 ARPE19 细胞株对 DMSO 不敏感。尽管巩膜成纤维细胞最小有毒体积分数较低, 但经细胞对系列 DMSO 体积分数分析发现其对 DMSO 的敏感性也不高。由于不同细胞对于 DMSO 的毒性敏感程度明显不同, 对于弱极性的试样, 在选择实验细胞株后有必要进行有机溶剂毒性实验, 以弥补研究中单纯设置 DMSO 对照的偏差。DMSO 的对照应该尽量接近最小有毒体积分数, 避免 DMSO 细胞毒性对药物毒性的干扰。MIO-M1 较其他眼组织细胞耐受好, 可能与 Müller 细胞在眼部的作用有关, 它贯穿视网膜全层, 对毒性的承受能力较强。HLEC 对 DMSO 的较好耐受性可能与其功能有关, 因眼表的角膜上皮细胞有较强的自我修复能力。另外一个很重要的原因可能是与细胞的生长速度有关, 生长快的细胞对外来毒性物质更敏感^[18]。

许多天然药物或合成药物的水溶性很差, 如曲安奈德、他克莫司等, 在进行药物筛选实验时需要加入有机溶剂或表面活性剂对其进行溶解, 提高药物的溶解性和可检测性。本实验选取 DMSO 作为体外筛选的助溶剂, 测定不同体积分数 DMSO 对 8 种细胞的生长抑制作用, 结果表明 DMSO 对细胞毒性随体积分数的增大而增强; 0.1% 的 DMSO 对部分细胞, 如内皮细胞, 存在毒性作用, 提示这种细胞在进行实验时要尽量用

最小体积分数的 DMSO, 而且一定要有与样品中 DMSO 相同体积分数的 DMSO 对照。

参考文献

- [1] Leong MC, Vedula SR, Lim CT, et al. Geometrical constraints and physical crowding direct collective migration of fibroblasts [J/OL]. *Commun Integr Biol*, 2013, 6(2): e23197 [2013-3-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3609846/>. doi: 10.4161/cib.23197.
- [2] Szurman P, Kaczmarek R, Spitzer MS, et al. Differential toxic effect of dissolved triamcinolone and its crystalline deposits on cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) cells [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(3): 584-592.
- [3] Nakamoto K, Urasaki T, Hondo S, et al. Evaluation of the crystalline and amorphous states of drug products by nanothermal analysis and Raman imaging [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 75: 105-111. doi: 10.1016/j.jpba.2012.11.020.
- [4] Parhi P, Mohanty C, Sahoo SK. Enhanced cellular uptake and *in vivo* pharmacokinetics of rapamycin-loaded cubic phase nanoparticles for cancer therapy [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(10): 3656-3669. doi: 10.1016/j.actbio.2011.06.015.
- [5] Bertelmann E, Pleyer U. Immunomodulatory therapy in ophthalmology—is there a place for topical application? [J]. *Ophthalmologica*, 2004, 218(6): 359-367.
- [6] Nachajski MJ, Zgoda MM. Selected Rofams as micellar solubilizers for diclofenac and naproxen in the environment of the standard vehicle for eye drops [J]. *Polim Med*, 2005, 35(3): 39-47.
- [7] Bishayee A, Rao DV, Bouchet LG, et al. Protection by DMSO against cell death caused by intracellularly localized iodine-125, iodine-131 and polonium-210 [J]. *Radiat Res*, 2000, 153(4): 416-427.
- [8] Pal R, Mamidi MK, Das AK, et al. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells [J]. *Arch Toxicol*, 2012, 86(4): 651-661. doi: 10.1007/s00204-011-0782-2.
- [9] Fiore M, Degraffi F. Dimethyl sulfoxide restores contact inhibition-induced growth arrest and inhibits cell density-dependent apoptosis in hamster cells [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 251(1): 102-110.
- [10] Adler S, Pellizzer C, Paparella M, et al. The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation [J]. *Toxicol In Vitro*, 2006, 20(3): 265-271.
- [11] Leschey KH, Hackett SF, Singer JH, et al. Growth factor responsiveness of human retinal pigment epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1990, 31(5): 839-846.
- [12] Gong L, Wu Q, Song B, et al. Differentiation of rat mesenchymal stem cells transplanted into the subretinal space of sodium iodate-injected rats [J]. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2008, 36(7): 666-671. doi: 10.1111/j.1442-9071.2008.01857.x.
- [13] Chen M, Muckersie E, Robertson M, et al. Characterization of a spontaneous mouse retinal pigment epithelial cell line B6-RPE07 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(8): 3699-3706. doi: 10.1167/iovs.07-1522.
- [14] Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos A, et al. Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin Cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2 [J]. *Water Res*, 2012, 46(5): 1566-1575. doi: 10.1016/j.watres.2011.12.044.
- [15] Prabhu BM, Ali SF, Murdock RC, et al. Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat [J]. *Nanotoxicology*, 2010, 4(2): 150-160.
- [16] Lee SH, Jaganath IB, Wang SM, et al. Antimetastatic effects of Phyllanthus on human lung (A549) and breast (MCF-7) cancer cell lines [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20994 [2013-3-21]. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0020994>. doi: 10.1371/journal.pone.0020994.
- [17] Vicari L, Musumeci T, Giannone I, et al. Paclitaxel loading in PLGA nanospheres affected the *in vitro* drug cell accumulation and antiproliferative activity [J/OL]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 212 [2013-08-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519087/>. doi: 10.1186/1471-2407-8-212.
- [18] Hou J, Li Y, Zhou Z, et al. Antiproliferative property of hexadecyloxypropyl 9-[2-(phosphonomethoxy) ethyl] guanine (HDP-PMEG) for unwanted ocular proliferation [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 627-637.

(收稿日期: 2013-09-30)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)