

曲伏前列素致高眼压模型大鼠结膜充血的不良反应机制研究

王洪宇*,裴存文#,法利,段运动(承德市中心医院眼科,河北承德 067000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3510-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.15

摘要 目的:研究曲伏前列素致高眼压模型大鼠结膜充血的不良反应机制。方法:将50只大鼠随机分为正常对照组、模型组和曲伏前列素低、中、高剂量组(100、200、400 mg/kg),每组10只。除正常对照组外,其余各组大鼠右眼建立高眼压模型,每天滴加相应药物1次,连续1周。末次给药后体外分离并培养各组大鼠右眼角膜周围血管内皮细胞,检测血管内皮细胞活力、细胞凋亡情况和增殖相关因子(Ki-76)、凋亡相关因子(Bad、Bax)、凋亡抑制相关因子(Bcl-2、Bcl-xl)蛋白表达水平。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠血管内皮细胞活力明显降低,凋亡率明显增加,Bad、Bax蛋白表达明显增强,Bcl-2、Bcl-xl、Ki-76蛋白表达明显减弱,以上差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,曲伏前列素低、中、高剂量组大鼠血管内皮细胞活力明显降低,凋亡率明显增加,Bcl-2、Bcl-xl蛋白表达明显减弱,以上差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);曲伏前列素中、高剂量组大鼠血管内皮细胞中Bad、Bax蛋白表达明显增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其余指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:曲伏前列素可能是通过促进高眼压模型大鼠角膜周围血管内皮细胞凋亡,从而降低其细胞活力,进而引发结膜充血这一不良反应。
关键词 曲伏前列素;高眼压;血管内皮细胞;不良反应;结膜充血;大鼠

Study on the ADR Mechanism of Conjunctival Hyperemia in Model Rats with Prostacyclin-induced High Intraocular Pressure
WANG Hongyu, PEI Cunwen, FA Li, DUAN Yundong (Dept. of Ophthalmology, Chengde Central Hospital, Hebei Chengde 067000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the ADR mechanism of conjunctival hyperemia in model rats with prostacyclin-induced high intraocular pressure. METHODS: 50 rats were randomly divided into normal control group, model group, prostacyclin low-dose, medium-dose, high-dose groups (100, 200, 400 mg/kg), 10 in each group. Except for normal control group, right eyes of rats in other groups were established high intraocular pressure model, dropping corresponding medicine once a day, for 1 week. After last administration, the right eyes corneal peripheral corneal endothelial cells of rats in each group were isolated *in vitro* and cultured. Vascular endothelial cell viability, cell apoptosis and proliferation-related factor (Ki-76), apoptosis-related factors (Bad, Bax), inhibito of apoptosis-related factors (Bcl-2, Bcl-xl) protein expressions were detected. RESULTS: Compared with normal control group, vascular endothelial cell viability in model group were obviously decreased; apoptosis rate was obviously increased; Bad, Bax protein expressions were obviously enhanced; Bcl-2, Bcl-xl, Ki-76 protein expressions were obviously weakened, with statistical significances ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, vascular endothelial cell viability in prostacyclin low-dose,

258.

[6] 胡东芳,徐内卫,黄萍,等.盐酸戊乙奎醚与氯解磷定治疗急性有机磷农药中毒疗效观察[J].中国药房,2006,17(16):1246-1247.

[7] Wass MN, Kelley LA, Sternberg MJ. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(13): 469-473.

[8] Durrant J, Amaro R, Mccammon J. AutoGrow: a novel algorithm for protein inhibitor design[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2009, 73(2): 168-178.

[9] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function[J]. *J Comput Chem*, 1998, 19(14): 1639-1662.

[10] Akrimah, Tjahyono DH, Musadad A. Docking of potent anticancer agents; 4-(pyrazol-4yl)-pyrimidine derivatives as selective cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors[J]. *International Journal of Chemical Engineering & Applications*, 2013, 4(6): 419-422.

[11] 蔡大升,裴凌.盐酸戊乙奎醚的作用机制及临床应用[J].军医进修学院学报,2008,29(2):152-154.

[12] 魏君,娄艳红,王旭光,等.高效液相色谱手性流动相添加剂法测定富马酸(R,R)-戊乙奎醚中3个光学异构体杂质的含量[J].中国药杂志,2013,48(2):136-139.

* 主治医师。研究方向:眼底病。电话:0314-2028095。E-mail: hongyu78w@163.com

通信作者:副主任医师,硕士。研究方向:眼底病。电话:0314-2028095。E-mail: peicunwen@126.com

(收稿日期:2016-12-13 修回日期:2017-06-09)

(编辑:刘明伟)

medium-dose, high-dose groups were obviously decreased; apoptosis rate was obviously increased; Bcl-2, Bcl-xl protein expressions were obviously weakened, with statistical significances ($P<0.05$ or $P<0.01$); the Bad, Bax protein expressions in prostacyclin medium-dose, high-dose groups were obviously enhanced ($P<0.05$ or $P<0.01$), the other indexes had no statistical differences ($P>0.05$). CONCLUSIONS: Prostacyclin may cause conjunctival hyperemia through promoting the apoptosis of corneal peripheral corneal endothelial cells of model rats with high intraocular pressure and decreasing the cell viability.

KEYWORDS Prostacyclin; High intraocular pressure; Vascular endothelial cell; ADR; Conjunctival hyperemia; Rats

青光眼发病率高,为不可逆及不可修复的致盲性疾病,其病理特征为眼内压力持续性升高导致眼球内部组织及功能受损,视网膜神经节细胞凋亡、坏死,视乳头损伤及进行性视野缺损^[1-4]。“早发现、早治疗”对挽救患者视力及提高其生活质量具有重要意义^[5]。现阶段治疗青光眼主要为降眼压、营养神经及抗炎治疗。滴眼液为便捷、简洁的常用药物治疗手段之一^[6-8]。曲伏前列素为 α 受体拮抗药,可舒张外周血管^[9],临床用于青光眼患者的降眼压治疗。滴眼后导致患者结膜充血是曲伏前列素的常见不良反应,也在一定程度上降低了患者的依从性。本实验经国家药物临床试验机构(GCP)中心伦理委员会审核通过,拟观察曲伏前列素对高血压模型大鼠角膜周围血管内皮细胞的影响,以期解释其导致结膜充血这一不良反应的发生机制,并为寻找合理有效的干预药物提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

3111型CO₂饱和湿度培养箱(美国Thermo公司); TL 3001型高倍光学荧光显微镜(上海锦伦光学仪器公司); EasyCyte 8型流式细胞仪检测仪(德国Merck公司); XLLD-III R型医用离心机(河北鑫乐科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

曲伏前列素滴眼液(上海凡泰医药公司,批号:16120201,规格:2.5 mL:0.1 mg); 内皮细胞鉴定试剂盒(南京华奥生物医药技术有限公司,批号:CK-0405); 胎牛血清(FBS,美国Gibco公司,批号:1453373,纯度:95%); 双抗青-链霉素、羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)-异硫氰酸荧光素(FITC)二抗(上海远慕生物科技有限公司,批号:15140-122、H20151201); 原位末端标记法(TUNEL)凋亡试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:06L28cm); 鼠源Ki-76(增殖相关因子)、Bad(促凋亡基因)、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2同源的水溶性相关蛋白(Bax)、B淋巴细胞瘤xl(Bcl-xl)多克隆抗体(美国Santa Cruz公司,批号:1607331、1607314、1607336、1606324、1606307)。

1.3 动物

SPF级健康SD大鼠,♂,体质量230~250 g,由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供,合格证号为SCXK(京)2016-2015。动物经明暗光照交替饲养12 h后,于20~25℃下饲养1周。

2 方法

2.1 高血压模型的建立

选取大鼠,ip给予10%水合氯醛(15 mL/g)进行全身麻醉,同时用盐酸普鲁卡因滴眼液进行眼球表面麻醉,显微手术下于右眼前房注入硅油0.1 mL,建立高血压模型;左眼不作处理。

2.2 分组和给药方法

采用随机数字表法将50只大鼠随机分为正常对照组、模型组和曲伏前列素低、中、高剂量组(100、200、400 mg/kg),每组10只。除正常对照组外,其余各组大鼠按“2.1”项下方法建立高血压模型,然后每组大鼠每天于右眼滴加相应药物1次,连续1周,正常对照组和模型组大鼠滴加等量的生理盐水。曲伏前列素给药剂量按人临床常用剂量换算而得。

2.3 角膜周围血管内皮细胞的培养

末次给药后,体外分离各组大鼠右眼角膜周围血管,待内皮细胞爬片后,胰酶消化,1 000 r/min(离心半径15 cm,下同)离心3 min,弃上清,用5 mL新鲜含10% FBS的 α -MEM完全培养基重悬,轻轻吹打,制成单细胞悬液(原代细胞);转移至10 cm培养皿中,置于37℃、5%的CO₂饱和湿度培养箱中,培养48 h后,首次换液;7~10 d后细胞达到融合,进行传代,此时记为P1代,之后每2~3 d换液1次。每次传代时计数,计算细胞倍增代数,倒置显微镜下观察细胞形态与生长情况。

2.4 血管内皮细胞的鉴定

参考文献[10]相关方法和内皮细胞鉴定试剂盒说明书操作,采用流式细胞术检测各组大鼠角膜周围血管内皮细胞表面标志物CD44、CD90、CD19、CD45的表达情况。将“2.3”项下原代细胞用胰酶消化后置于10 mL离心管中,用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗1次,室温下1 000 r/min离心5 min,弃PBS;加预冷的2%牛血清蛋白(BSA)2 mL,快速混匀,4℃封闭30 min;加入内皮细胞鉴定试剂盒中的小鼠血管内皮细胞特异性一抗(比例为1:10),4℃孵育30 min;室温下1 000 r/min离心5 min,弃上清,用PBS洗涤3次后,用PBS重悬;加入羊抗鼠IgG-FITC二抗(比例为1:100),4℃避光孵育30 min;用PBS洗涤2次后,用PBS重悬,用流式细胞仪检测内皮细胞表面标志物CD44、CD90、CD19、CD45的表达情况。

2.5 CCK-8法测定血管内皮细胞活力

参考文献[11]相关方法和TUNEL凋亡试剂盒说明

书要求,将“2.3”项下原代细胞以500个/孔铺于96孔板中,置于37℃、5%CO₂培养箱中,培养3h;每孔加入10μL CCK-8试剂,培养24h后,用酶标仪于450nm波长处测定光密度(OD)。

2.6 TUNEL法检测细胞凋亡情况

参考文献[12]相关方法,采用TUNEL法检测细胞凋亡情况。将“2.3”项下原代细胞以70%密度爬片,待细胞完全稳定贴壁后,固定,封闭;加入TUNEL反应液,显色,用光学荧光显微镜观察显红色荧光的凋亡细胞。

2.7 Western blot法检测细胞增殖与凋亡相关因子的蛋白表达

参考文献[11]相关方法,采用Western blot法检测细胞增殖及凋亡相关因子的表达。取“2.3”项下原代细胞,测定总蛋白浓度。分别取45μg蛋白与等体积2倍的上样缓冲液混匀后,100℃变性10min,随后进行不连续十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离:5%浓缩胶,12%分离胶,80V电泳20min,待条带迁移至分离胶上缘时调整为120V电泳80min;采用湿转法将蛋白转入硝酸纤维素膜,350mA电转移60min;封闭,PBS洗脱;加入鼠源Ki-76、Bad、Bcl-2、Bax、Bcl-xl多克隆抗体(稀释比例1:200),封口,孵育过夜后,洗膜3次;再加入二抗(稀释比例1:5000),孵育1h后洗膜3次;显色,采用Imaga J软件进行图像的采集与分析。以目标条带的灰度值与内参甘油醚-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的灰度值之比表示蛋白的表达水平。试验重复6次。

2.8 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 角膜周围血管内皮细胞形态与鉴定结果

原代细胞培养首次换液后,贴壁细胞多为单个长梭形细胞,偶尔可见几个细胞的克隆;细胞在传代3次后,形态均一,呈长梭形,融合时呈漩涡状生长。流式细胞仪检测内皮细胞表面标志物CD44、CD90、CD19、CD45的结果显示,体外分离细胞均表现CD44⁺(99.86 ± 5.934)%、CD90⁺(95.10 ± 2.013)%、CD19⁻(0.68 ± 0.612)%、CD45⁻(0.31 ± 0.117)%,这一结果表明已成功建立大鼠角膜周围血管内皮细胞培养体系。大鼠角膜周围血管内皮细胞的形态图见图1。

3.2 血管内皮细胞活力的测定结果

与正常对照组,其余各组大鼠血管内皮细胞活力均明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠血管内皮细胞活力均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且随着曲伏前列素给药剂量的增加血管内皮细胞活力呈下降趋势。各组大鼠血管内皮细胞活力的测定结果见图2。

3.3 血管内皮细胞凋亡的测定结果

正常对照组、模型组和曲伏前列素低、中、高剂量组

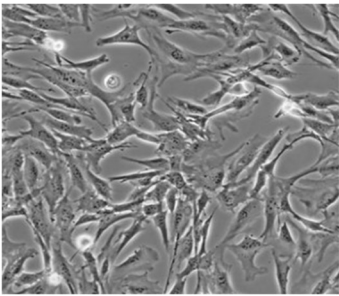
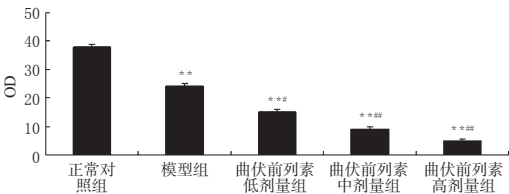


图1 大鼠角膜周围血管内皮细胞的形态图(×400)
Fig 1 Morphology of corneal peripheral vascular endothelial cells of rats(×400)



注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

图2 各组大鼠血管内皮细胞活力的测定结果
Fig 2 Determination results of vascular endothelial cell viability of rats in each group

大鼠血管内皮细胞凋亡率分别为(2.21 ± 1.36)%、(20.63 ± 3.65)%、(28.13 ± 4.37)%、(36.04 ± 5.64)%、(49.26 ± 5.86)%($n = 6$)。与正常对照组比较,其余各组大鼠血管内皮细胞凋亡率均明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠血管内皮细胞凋亡率均明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且随着曲伏前列素给药剂量的增加血管内皮细胞凋亡率呈上升趋势。

3.4 血管内皮细胞增殖与凋亡相关因子蛋白表达的测定结果

与正常对照组比较,其余各组大鼠血管内皮细胞中Ki-76、Bcl-2、Bcl-xl蛋白表达均明显减弱,Bad、Bax蛋白表达均明显增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠血管内皮细胞中Bcl-2、Bcl-xl蛋白表达均明显减弱($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);曲伏前列素中、高剂量组大鼠血管内皮细胞中Bad、Bax蛋白表达均明显增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其余指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血管内皮细胞中凋亡相关因子和增殖相关因子蛋白表达的测定结果见表1。

4 讨论

青光眼高血压所致患者眼球内部结构压迫、眼球血管供血不足是引起患者视力减退的重要因素之一。曲伏前列素用于治疗青光眼高血压具有起效快、降压效果好等优点,但其最常见的不良反应是可引起患者结膜充血,进而引起眼部瘙痒、不适等^[13-14]。

有研究表明,在使用曲伏前列素滴眼的青光眼患者

表1 各组大鼠血管内皮细胞中凋亡相关因子和增殖相关因子蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Determination results of protein expressions of apoptosis-related factors and proliferation-related factors of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Ki-76	Bax	Bad	Bcl-2	Bcl-xl
正常对照组	18.37±3.29	2.26±0.32	3.27±1.46	26.51±1.29	44.32±1.83
模型组	3.56±0.29**	14.62±5.11**	20.02±2.49**	20.56±2.66*	32.22±4.37**
曲伏前列腺素低剂量组	3.21±1.02**	16.11±3.26**	24.63±4.37**	15.33±3.84***	25.59±6.22***
曲伏前列腺素中剂量组	2.98±0.67**	21.66±4.38***	25.32±2.69***	8.14±4.28***	18.11±6.47***
曲伏前列腺素高剂量组	2.96±0.21**	27.39±6.53***	34.98±6.11***	6.55±3.33***	8.58±8.49***

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

Note: vs. normal control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$; vs. model group,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

中发现,仅仅只在结膜及角膜周围血管内观察到血管扩张,眼球其余部位却未见血管扩张^[15-16]。这一发现提示,曲伏前列腺素所致血管扩张这一不良反应,并不仅仅只是 α 受体受拮抗导致血管舒张。因此,为进一步探究曲伏前列腺素所致结膜充血的具体机制,本研究从分子细胞生物学角度,研究了曲伏前列腺素对高眼压模型大鼠角膜周围血管内皮细胞的影响。结果表明,曲伏前列腺素可能是通过促进高眼压模型大鼠角膜周围血管内皮细胞凋亡,降低其细胞活力,进而引发结膜充血这一不良反应。

与国内外现有的研究结果比较,本研究首次发现了曲伏前列腺素可通过促凋亡以降低血管内皮细胞活力这一现象。本实验结果为解释滴用曲伏前列腺素后患者结膜充血这一不良反应提供了实验依据。此外,本研究初步发现干预血管生物学特性的新机制,从另一角度为寻找合理有效的干预血管增生的药物提供了新依据。本研究不足之处在于,本实验结果系通过实验室动物模型来得到的,对于临床的实际意义还不明确,尚需今后开展一系列的与曲伏前列腺素在临床应用有关的临床研究来证实。

参考文献

[1] Cao Y, Xiong J, Mei S, et al. Aspirin promotes bone marrow mesenchymal stem cell-based calvarial bone regeneration in mini swine[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, doi: 10.1186/s13287-015-0200-4.

[2] 余佳文,程斌,槐香烯诱导肿瘤细胞凋亡分子机制研究进展[J]. *中国药房*, 2013, 24(35):3348-3350.

[3] Estruch R, Ros E, Salas-salvadó J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(14):1279-1290.

[4] 马晓磊,吕安林,郭忠尚,等.阿司匹林对心肌微血管内皮细胞血管新生功能的影响[J]. *心脏杂志*, 2015, 51(3):265-270.

[5] 叶锦霞,吴广文,李西海,等.透骨消痛胶囊对凋亡软骨细

胞 Rac1 和 Cdc42 表达的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(42):6747-6751.

[6] 闫浩,陈彤.骨髓间充质干细胞与骨髓内细胞间相互作用关系及其进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2013, 9(4):889-893.

[7] 黄妍,曾昆,徐彪.氨甲酰促红细胞生成素对糖尿病模型大鼠冠脉微循环内皮细胞的影响[J]. *中国药房*, 2016, 27(25):3488-3491.

[8] Marques MM, Diniz IM, de Cara SP, et al. Photobiomodulation of dental derived mesenchymal stem cells: a systematic review[J]. *Photomed Laser Surg*, 2016, 12(7):114-115.

[9] 刘春姿,韩红波.曲伏前列腺素对开角型青光眼眼部血流动力学及对内源性调节因子的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(7):606-608.

[10] 王俊如,赵秀丽,马科,等.前列腺素受体基因多态性与曲伏前列腺素降眼压疗效的相关性[J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, 30(3):190-193.

[11] Tseng CL, Chen ZY, Renn TY, et al. Solvent/detergent virally inactivated serum eye drops restore healthy ocular epithelium in a rabbit model of dry-eye syndrome[J]. *Plos One*, 2016, 11(4):e0153573.

[12] Sanseau A, Sampaolesi J, ERS Jr, et al. Preference for a fixed combination of brinzolamide/timolol versus dorzolamide/timolol among patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension[J]. *Clin Ophthalmol*, 2013, doi: 10.2147/oph.S38575.

[13] Alezzandrini A, Hubatsch D, Alfaro R. Efficacy and tolerability of fixed-combination brinzolamide/timolol in latin american patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension previously on brimonidine/timolol fixed combination[J]. *Adv Ther*, 2014, 31(9):975-985.

[14] Choh V, Gurdita A, Tan B, et al. Short-term moderately elevated intraocular pressure is associated with elevated scotopic electroretinogram responses[J]. *Invest Ophth Vis Sci*, 2016, 57(4):2140-2151.

[15] Mizoue S, Nakano T, Fuse N, et al. Travoprost with sof-Zia® preservative system lowered intraocular pressure of Japanese normal tension glaucoma with minimal side effects[J]. *Clin Ophthalmol*, 2014, doi: 10.2147/oph.S57640.

[16] Igarashi R, Togano T, Sakaue Y, et al. Effect on intraocular pressure of switching from latanoprost and travoprost monotherapy to timolol fixed combinations in patients with normal-tension glaucoma[J]. *J Ophthalmol*, 2014, doi:10.1155/2014/720385.

(收稿日期:2017-02-08 修回日期:2017-05-27)
(编辑:邹丽娟)