

THE ROLE OF UBIQUITIN IN ACLARUBICIN COMBINATION WITH CISPLATIN TO KILL OVARIAN CELLS

YIN Mei Yun YAN Yun Li* ZHOU Na Jing ZHENG Li Fen

(Cell Biology Division, Institute Basic Medicine Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT For investigating the role of ubiquitin in aclarubicin(ACR) combination with cisplatin(CDDP) to kill ovarian cancer cells, the peak serum concentration of ACR and CDDP were used separately, or combined with each other to treat the SKOV₃ ovarian cancer cell line for 24 hours. The double fluorescence stain with acridine orange and ethidium bromide was performed to detect the cell vitality. The clone culture method was used to test the cell viability. The immunocytochemistry stain was applied to observe ubiquitin expression of the cells after induced by the drugs. It was observed that the cell vitality was 78.3 ± 3.1 for the ACR alone, 70.1 ± 6.6 for the CDDP alone, and 50.8 ± 3.2 for the ACR combined with CDDP ($P < 0.05$). It was shown that treatment with ACR and CDDP could significantly reduce the cell viability to contrast with only ACR or CDDP used depending on the results of clone culture. It was also noticed that there is a higher ubiquitin expression in the cells by the two drugs used together over the other groups. In conclusion, ACR combined with CDDP can increase the efficiency of killing the ovarian cancer cells, and the ubiquitin-protein degradation system might play an important role in it.

Key words: Ubiquitin Aclarubicin Cisplatin Ovarian cancer cell

* Corresponding author. E-mail: yanyl@hebm. edu. cn

冷冻对视网膜色素上皮细胞分泌肝细胞生长因子的影响

陶晓锋 王方* 顾青

(上海交通大学附属第一人民医院眼科 上海市眼科研究所 上海 200080)

摘要 本研究观察冷冻处理后的人视网膜色素上皮细胞 (human retinal pigment epithelium cells, hRPE) 在体外培养和体内玻璃体环境中分泌肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 水平的变化, 调查变化后的玻璃体对正常 RPE 细胞的促增生作用。体外培养的 RPE 细胞在 -80°C 下进行冷冻, 冷冻时间分为 0s、15s 和 60s, 随后继续体外培养和注入正常兔眼玻璃体, 冷冻后的第 3d 和 6d 收集细胞培养液和玻璃体样本, ELISA 法测定 hHGF 含量; 进一步, 用 MTT 法测定正常 RPE 细胞加入玻璃体样本后的生长状态。结果显示冷冻刺激 RPE 细胞 hHGF 的分泌增多, 并可促进 RPE 细胞增生。

关键词: 视网膜色素上皮细胞 冷冻 肝细胞生长因子 增生性玻璃体视网膜病变

随着对增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 研究的深入, 许多学者认为肝细胞生长因子 (human hepatocyte growth factor, hHGF) 在 PVR 的发生发展中扮演了重要的作

用^[1,2]。HGF 是具有多种生物效应的生长因子, 参

本文 2003 年 3 月 7 日收到, 2003 年 7 月 12 日接受。

* 通讯作者。E-mail: milwang@public7. sta. net. cn

与多种细胞的伤口愈合^[1]。研究显示,在人视网膜色素上皮(human retinal pigment epithelium, hRPE)细胞,HGF以自分泌和旁分泌形式促进其迁移和增殖^[3]。冷凝是视网膜脱离手术中常用的一种方法,但又是发生术后PVR的危险因素之一^[4,5]。多项研究表明,冷冻可导致RPE细胞功能改变^[6,7]。本研究对体外培养的RPE细胞进行冷冻,证明冷冻对RPE细胞HGF表达的变化,且表达的变化将促进正常RPE细胞增殖。

材料和方法

1. 材料

(1) RPE细胞 来源于本院角膜移植的供体眼球。24小时内取材。

(2) 主要试剂 DMEM、F₁₂培养基、胎牛血清(美国GIBCO公司产品),消化液0.25% EDTA、Trypsin(美国Sigma公司产品)。hHGF ELISA Quantitive Kit(美国R&D公司产品)。

(3) 主要器材 日本三洋恒温培养箱、Olympus IX-ILL100LH型显微镜,美国Eppendorf Centrifuge 5804R和5417C离心机、Revoc低温冷藏箱。

2. 方法

(1) 细胞培养和冷冻 培养条件为DMEM/F12+10%小牛血清,37℃、5% CO₂下孵育。传代2-3次,待细胞融合70%-80%时使用。消化液使用0.25% EDTA-Trypsin,置于37℃、5% CO₂环境中消化2-5s。融合状态生长良好的RPE细胞,常规消化计数后,用0.1mol/L PBS洗涤并悬浮细胞,按预定细胞数分装入1ml注射器,每支液体总量为100μl,在-80℃下冷冻,按冷冻时间不同分成0s、15s、60s 3组,应用数字测温仪(WMY-01C,上海华辰医用仪表有限公司)测定容器内悬浮细胞温度。

(2) 冷冻RPE细胞HGF含量测定 3组冷冻处理后细胞仍置于上述培养条件下体外培养,分别于3天和6天时取培养液,10℃,12000rpm离心后取其上清测定HGF含量。

(3) 实验动物 本院实验动物房饲养的健康成年新西兰白兔32只,右眼实验眼,左眼对照眼,雌雄不限。术眼常规扩瞳、麻醉后,1ml胰岛素注射器距角膜缘后2-3mm处进玻璃体腔,进针5-7mm,靠近视网膜后极部推入细胞

悬液。每只兔眼注射悬液体积100μl,含RPE细胞1×10⁵-2×10⁵个。按实验要求,动物分成空白对照组4只眼(玻璃体腔未注射任何液体)、未冷冻对照组4只眼(注入未冷冻的RPE细胞)、冷冻15s组12只眼(细胞冷冻15s后注入)和冷冻60s组12只眼;分别于3天和6天时取材。

(4) 兔眼玻璃体HGF浓度的测定 兔眼玻璃体标本在10℃,12000rpm离心后取上清测定HGF含量。

(5) ELISA法测定HGF浓度 根据说明书按步骤加样,最后在450nm下读取各样本光密度值(A)。每个样本复孔3个。得到的A值其对数与HGF浓度的对数值呈线性关系,依此换算得到HGF浓度。

(6) 兔眼玻璃体样本对RPE细胞生长的影响 将注入了不同冷冻强度处理后RPE细胞的第6天玻璃体样本[见“(3)实验动物”]加入到预先培养、生长状态良好的正常RPE细胞培养液中,48h后应用MTT比色法测定,570nm下读取各样本A值,计算各孔成活细胞数。

(7) 统计学处理方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用区组方差分析,以 $P < 0.05$ 作为差异有显著性标准。统计软件为SPSS for windows 10.0。

结 果

1. 实验RPE细胞温度

悬浮在1ml容器内的RPE细胞在-80℃冰箱放置15s和60s后,测得的温度分别为14℃-17℃和-1.3℃-2.4℃。

2. 兔眼术前术后观察

32只兔眼术前检查均未发现视网膜裂孔、出血、玻璃体浑浊等。术后第1天11只眼轻微葡萄膜反应,其余无葡萄膜反应;术后第2天有3只眼发生白内障,第6天有1只眼发生白内障,但不影响观察眼底,仍纳入实验。6只眼玻璃体内见到纤维条索形成,5只眼玻璃体轻度浑浊但无纤维条索形成,其余眼玻璃体均无浑浊。所有兔眼观察眼底无视网膜裂孔,无眼底出血。

3. 冷冻RPE细胞HGF含量测定

结果见表1。15s组在6天时HGF水平显著增高;而60s组在3天时即见到增高,6天时更显著;各组间差异显著($F = 27.36, P < 0.01$)。

表1 冷冻后体外培养的RPE细胞分泌HGF含量(mg/ml)

	对照 (未冷冻)	3天		6天	
		冷冻15s	冷冻60s	冷冻15s	冷冻60s
细胞上清HGF含量	2.14 ± 0.29	2.02 ± 0.89	2.93 ± 0.71*	3.64 ± 0.23**	4.19 ± 0.51**

* 与对照组比较,差异有意义($P < 0.05$)。

** 与对照组比较,差异有显著意义($P < 0.01$)。

4. 兔眼玻璃体 HGF 含量测定

各组测得的 HGF 浓度见表 2。在 3 天和 6 天时 60s 组 HGF 水平显著升高,分别为 6.58 ± 1.38 和 6.73 ± 2.47 ($P < 0.01$); 15 秒组在第 6 天 HGF 水平显示升高,为 6.00 ± 0.88 ($P < 0.05$), 各组间 HGF 浓度有显著差异 ($F = 6.24$, $P < 0.01$)。

表 2 兔眼玻璃体 HGF 含量 (pg/ml)

	对照组	未冷冻组	冷冻 15s	冷冻 60s
3 天	4.13 ± 0.67	4.33 ± 1.03	4.63 ± 0.69	$6.58 \pm 1.38^{**}$
6 天	4.21 ± 0.57	4.89 ± 1.28	$6.00 \pm 0.88^*$	$6.73 \pm 2.47^{**}$

* 与对照组比较,差异有意义 ($P < 0.05$)。

** 与对照组比较,差异有显著意义 ($P < 0.01$)。

5. 兔眼玻璃体样本对 RPE 细胞生长的影响

加入各组样本后, RPE 生长情况见表 3。各组间 A 值有显著差异 ($F = 16.69$, $P < 0.01$); 15s 组与对照组比较没有显著差异,但 60s 组 A 值 (0.30 ± 0.19) 与对照组 (0.18 ± 0.16)、未冷冻组 (0.19 ± 0.02) 和 15s 组 (0.19 ± 0.26) 比较都有显著差异。

表 3 兔眼玻璃体样本对 RPE 细胞生长的影响
(A: $x \pm s$, 波长 570nm)

	对照组	未冷冻组	15s 组	60s 组
A 值	0.18 ± 0.16	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.26	$0.30 \pm 0.19^{**}$

** 与对照组、未冷冻组和 15 秒组比较有显著差异 ($P < 0.01$)。

讨 论

1. 冷冻对 RPE 细胞的影响

冷凝封闭视网膜裂孔的主要缺点是破坏 RPE 细胞的生物学功能和血-视网膜屏障,两者都认为是 PVR 发生的危险因素^[4,5]。有研究证实,冷冻 RPE 细胞 30s - 60s 后,其胞内 Ca^{2+} 浓度增高, cAMP 水平降低^[6]。本研究为了让实验性冷冻尽可能相适于临床的冷凝治疗,在设计实验时作了如下考虑:(1)临床封闭视网膜裂孔时,冷冻头与组织(巩膜)接触少于 15s 时,点接触部位可产生 -60°C 的低温,在冰球临界部位的温度约 $0 - -3^{\circ}\text{C}$ ^[13]。考虑到冷冻细胞要继续进行实验研究,因此本实验只能对一定程度低温下的 RPE 细胞展开调查。在一系列的冷冻时间比较后,我们选择了 15s 和 60s 两个冷冻时间,容器内细胞的温度分别是 14°C 和

-1.3°C , 在这样一个低温下, RPE 细胞的一些生物学行为已经发生了改变。事实上,临床冷凝治疗导致的 RPE 细胞损伤和血-视网膜屏障破坏并非仅限于在冷冻头的接触点,周围组织的低温也将是影响因素,符合我们的研究结果。(2)据文献报道,裂孔面积较大是术后发生 PVR 的危险因素^[4]。一个正常 RPE 细胞平均为 $8 \times 16 \mu\text{m}$ 大小^[8], 5 个视盘面积的裂孔将使 $1 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ 个 RPE 暴露于玻璃体环境,据此成为本实验在兔玻璃体注射 $1 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ 个 RPE 细胞的理论依据。

2. 肝细胞生长因子 (hHGF) 在 PVR 中的作用

HGF 是由一条 69kd 的重链和一条 34kd 的轻链构成的异源二聚体,属双环结构的 Kringle 蛋白家族。HGF 具有促细胞分裂、运动和转化等作用^[1]。其受体是 c-Met 原癌基因编码产物,在几乎所有组织的上皮细胞中都有表达^[1]。经证实^[1,3,12], RPE 细胞以自分泌的方式产生 hHGF, hHGF 在 PVR 眼内浓度显著增高,认为是一种对 PVR 发生发展起重要作用的细胞因子^[2,9,10]。最近报道又指出 HGF 具有促进 RPE 细胞从基底膜游离,可能对 PVR 的启动起重要作用^[11]。

3. RPE 细胞微环境的改变

本研究发现冷冻可导致术后 RPE 细胞分泌 HGF 增加,且冷冻时间延长细胞分泌 HGF 浓度增加。当冷冻后的 RPE 细胞注入兔眼玻璃体后 HGF 的分泌水平发生改变,用这些玻璃体加到正常 RPE 细胞培养液后,促进细胞的增殖。引起注意的是,我们在兔眼测得的 HGF 浓度值低于在 PVR 患者玻璃体中测得的浓度^[9]。可能的原因是:(1)种属差异,(2)临床 PVR 的环境更复杂, HGF 有多种来源,(3)本实验是异种细胞接种,微环境差别可能影响到 RPE 细胞的生物功能,(4)在兔玻璃体不易扩散,(5)本实验观察时间为 6 天,短于临床 PVR 患者的观察期。

4. 结论

在视网膜脱离手术中,尽管承认冷凝是术后发生 PVR 的危险因素,但是尚缺乏肯定的生物学证据,直接揭示冷凝与 PVR 之间的联系的研究更少。本实验通过测量冷冻后 RPE 细胞在玻璃体环境内合成 HGF 水平,以及玻璃体标本对正常 RPE 细胞增殖的影响,提示临床上的冷凝治疗可能促使 RPE 细胞增加 HGF 的分泌以及随后发生的细胞增殖,从细胞生物学水平证实了冷凝与 PVR 之间的内在联系,为临床合理实施冷凝治疗提供进一步理论依据,

为今后进一步研究药物或其他治疗 PVR 奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Grierson I et al. , 2000, *Prog Retin Eye Res*; **19**: 779 - 802.
- [2] Briggs MC et al. , 2000, *Invest Ophthalmol Vis Sci*; **41**: 3085 - 3094.
- [3] He PM et al. , 1998, *Biochem Biophys Res Commun* **249**: 253 - 257.
- [4] Nagasaki H et al. , 1998, *Prog Retin Eye Res*. **17**: 77 - 98.
- [5] Pastor JC et al. , 2002, *Prog Retin Eye Res*. **21**: 127 - 144.
- [6] 洪晶等, 1998, 中华眼科杂志, **34**: 62 - 64.
- [7] 许迅等, 1995, 中华眼底病杂志, **11**: 175 - 177.
- [8] 倪倬, 2002, 上海科学普及出版社, 眼的病理解剖基础与临床, pp250.
- [9] Mitamura Y et al. , 2000, *Am J Ophthalmol*. **129**: 678 - 680.
- [10] Lashkari K et al. , 1999, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **40**: 149 - 156.
- [11] Jin M et al. , 2002, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **43**: 2782 - 2790.
- [12] Van Aken EH et al. , 2003, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **44**: 463 - 472.
- [13] 郭希让主编, 1997, 海天出版社, 现代视网膜玻璃体手术学, pp85.

EFFECT OF FREEZING ON EXPRESSION OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR (HGF) IN HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIUM CELLS (RPE)

TAO Xiao Feng WANG Fang* GU Qing

(*Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China*)

ABSTRACT To investigate hepatocyte growth factor (HGF) concentration in frozen human retinal pigment epithelium cells (hRPE) both in vitro and in vivo. To evaluate the effect of HGF induced hRPE proliferation. Cultured hRPE cells (3rd - 5th passages) were frozen at -80°C for 15 seconds and 60 seconds. The following substances were tested: (1) The frozen cells were incubated for further. (2) Intravitreal injection of frozen cells in Rabbits. The cell supernate and vitreous samples were collected at 3 days and 6 days. The concentration of HGF was monitored by ELISA assay. (3) Some vitreous samples were added into non-freezing hRPE cells culture media and the cell proliferation was examined by MTT assay. We found that freezing can increase expression of HGF in hRPE cells. The vitreous samples (with frozen hRPE cells) can induce the hRPE cell proliferation.

Key words: Human retinal pigment epithelium (hRPE) Cryotherapy Human hepatocyte growth factor (hHGF) Proliferative vitreoretinopathy (PVR)

* Corresponding author. E-mail: milwang@public7. sta. net. cn

2004 年报刊征订工作即将开始, 请就近向所在地邮局办理订阅《细胞生物学杂志》, 邮发代号: 4 - 296。