

# 荷载 Zebularine 的聚合物胶束复合体纳米颗粒对体外培养的晶状体上皮细胞增殖和黏附的影响

刘思伟, 王 群, 康前雁

作者单位: (710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学第一附属医院眼科

作者简介: 刘思伟, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 白内障、青光眼。

通讯作者: 刘思伟. whylsw@vip.sina.com

收稿日期: 2014-09-17 修回日期: 2014-12-19

## Effect of Zebularine loaded MePEG - PCL nanoparticles on viability, attachment of *in vitro* cultured lens epithelial cells

Si-Wei Liu, Qun Wang, Qian-Yan Kang

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Si-Wei Liu. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. whylsw@vip.sina.com

Received: 2014-09-17 Accepted: 2014-12-19

### Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of zebularine (Zeb) loaded Poly (ethylene glycol) - block - poly ( $\epsilon$  - caprolactone) methyl ether (MePEG - PCL) nanoparticles (NPs) on the viability, attachment, and apoptosis of *in vitro* cultured lens epithelial cells (LECs).

• **METHODS:** *In vitro* cultured infant human lens tissue HLE B - 3 immortalized cells were distributed randomly divided into six groups. Each group was administered with free Zeb 50  $\mu$ mol/L (ZebF1 group), 100  $\mu$ mol/L (ZebF2 group), Zeb - loaded MePEG - PCL NPs 50  $\mu$ mol/L (ZebNP1 group), Zeb - loaded MePEG - PCL NPs 100  $\mu$ mol/L (ZebNP2 group), MePEG - PCL empty NPs (NPs group) or blank medium (group C) respectively. A tetrazolium dye assay (MTT) test and modified MTT test were performed to determine cell viability and cell attachment. DNA ladder was used to detect the cell apoptosis.

• **RESULTS:** Determined by MTT colorimetric method: Cell proliferation rate of LECs were suppressed by all Zeb administration groups in a concentration - time dependent manner ( $P < 0.05$ ). Compared with the free Zeb groups, the viability of LECs were suppressed more effectively by the same dose of Zeb loaded MePEG - PCL NPs after 24, 48, 96h ( $P < 0.05$ ). Determined by improved MTT colorimetric method: The attachment of LECs were decreased in all Zeb administration groups, Zeb loaded MePEG - PCL NPs had better effect on suppressing the attachment of LECs than the free Zeb groups with same

dose ( $P < 0.05$ ). The DNA ladder confirmed that after administration of 96h, group C, NPs group and ZebF1 group showed no DNA fragment, however the DNA fragment were performed in ZebF2, ZebNP1, ZebNP2 groups and displays the trend of ZebNP2 > ZebNP1 > ZebF2 ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Zeb loaded MePEG - PCL NPs had better effect on suppressing the viability and attachment of *in vitro* cultured LECs than the free Zeb groups, as well as enhancing the apoptosis.

• **KEYWORDS:** Zebularine; Poly (ethylene glycol) - block - poly ( $\epsilon$  - caprolactone) methyl ether; lens epithelial cells

**Citation:** Liu SW, Wang Q, Kang QY. Effect of Zebularine loaded MePEG - PCL nanoparticles on viability, attachment of *in vitro* cultured lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015; 15(1):26-29

### 摘要

**目的:** 研究荷载 Zebularine (Zeb) 的聚合物胶束复合体 (MePEG - PCL) 纳米颗粒 (NPs) 对体外培养的晶状体上皮细胞 (LECs) 活性、黏附性和凋亡的影响。

**方法:** 体外培养胎儿晶状体组织 HLE B - 3 永生细胞, 分为 6 个组, 分别给予游离 Zeb 50  $\mu$ mol/L (ZebF1 组)、100  $\mu$ mol/L (ZebF2 组)、荷载 Zeb 的 MePEG - PCL NPs 50  $\mu$ mol/L (ZebNP1 组)、100  $\mu$ mol/L (ZebNP2 组)、MePEG - PCL 空载颗粒 (NPs 组)、空白培养基 (C 组), 分别采用 MTT 比色法、改良 MTT 比色法观察细胞活性、黏附性, 采用 DNA ladder 法研究细胞凋亡。

**结果:** MTT 比色法显示: 游离 Zeb 和荷载 Zeb 的 MePEG - PCL NPs 对细胞活性有抑制作用, 均呈时间 - 剂量依赖性增强 ( $P < 0.05$ ), 与游离组相比, 相同剂量荷载 Zeb 的 MePEG - PCL NPs 组在给药 12h 时细胞活性无差异, 而给药 24, 48, 96h 后载体组细胞活性降低 ( $P < 0.05$ )。改良 MTT 比色法显示: 所有 Zeb 给药组细胞黏附率均降低, 与游离组相比相同剂量荷载 Zeb 的 MePEG - PCL NPs 组黏附率降低 ( $P < 0.05$ )。DNA ladder 显示: 给药后 96h C 组、NPs 组、ZebF1 组未出现 DNA 碎片表达, ZebF2, ZebNP1, ZebNP2 组出现 DNA 碎片表达, 其表达强度依次为 ZebNP2 > ZebNP1 > ZebF2 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** 荷载 Zeb 的 MePEG - PCL NPs 可有效地抑制体外培养的 LECs 活性、黏附性, 造成细胞的凋亡, 其效果优于同剂量的游离药物。

**关键词:** Zebularine; 聚合物胶束复合体纳米颗粒; 晶状体上皮细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.1.06

引用:刘思伟,王群,康前雁. 荷载 Zebularine 的聚合物胶束复合体纳米颗粒对体外培养的晶状体上皮细胞增殖和黏附的影响. 国际眼科杂志 2015;15(1):26-29

## 0 引言

后发性白内障是白内障囊外摘除联合后房型人工晶状体植入术后最常见的并发症,也是术后视力再次下降的主要原因,严重影响患者的术后视力<sup>[1]</sup>。关于 PCO 形成的原因,目前公认的主要机制是术后残留的晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)增生、黏附、移行和上皮间质转分化<sup>[2]</sup>。

Zebularine([1-(β-D-呋喃核糖苷)-1,2-二氢嘧啶-2-酮])是一种新型的抗肿瘤药物,是强有力的 DNA 甲基转移酶抑制剂,并在同类对比研究中显示出低毒、稳定等良好特性。研究显示其可以抑制晶状体上皮细胞增殖、移行、纤维化过程,从而起到预防和治疗 PCO 的作用<sup>[3,4]</sup>。

传统眼用制剂用药后均易被泪液冲刷而从鼻泪管流失,在角膜前的半衰期仅 1~3min,生物利用度不到 5%<sup>[5]</sup>。以聚合物胶束复合体纳米颗粒(MePEG-PCL NPs)为载体的药物传递系统可通过药物的持续释放,增加药物与处于生长周期中不同时相的靶细胞的接触时间,起到延长药物有效作用时间,降低药物浓度,减少副作用的目的<sup>[6]</sup>。

本实验拟研究荷载 Zeb 的 MePEG-PCL NPs 对体外培养的 LECs 活性、黏附性影响,为进一步将该药物载体系统应用于体内,实现后发性白内障缓释治疗奠定实验基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Zeb、MePEG-PCL NPs、采用溶剂蒸发技术制作的荷载 Zeb 的 MePEG-PCL NPs 均购自于 Sigma(Sigma Aldrich, MO, USA)。经腺病毒 SV40 转化的胎儿晶状体组织 HLE B-3 永生细胞系购自 ATCC(Rockville, MD, USA)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞活性测定** 采用含 20% 胎牛血清的 DMEM(GIBCO BRL, Grand Island, NY)将 HLE B-3 细胞置于培养箱(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)中常规培养、传代。将 HLE B-3 细胞 2×10<sup>4</sup>/mL 接种于 96 孔培养板中,100μL/孔,37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24h,分为 6 个组(ZebF1; ZebF2; ZebNP1; ZebNP2; NPs; C)分别加入游离 Zeb 50μmol/L、100μmol/L、荷载 Zeb 的 MePEG-PCL NPs 50μmol/L、100μmol/L、MePEG-PCL 空载 NPs、空白对照组同前条件孵育,分别在 12, 24, 48, 96h 后加入含有 MTT(5mg/mL, 20μL; Sigma, USA)的新鲜培养基 150μL,孵育 4h,弃去上清,加入 150μL 100% DMSO(Sigma),震荡 10min,酶标仪读取波长 590nm 处吸光度。每组测试 8 孔取均数。

**1.2.2 细胞凋亡测定** 同前方法给药 96h 后收集 5×10<sup>5</sup> 细胞悬液, PBS 洗涤, 2000r/min 4℃ 离心 5min, 弃上清, 按照 DNA ladder 试剂盒(Promega, USA)说明提取细胞 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色紫外光下观察, 凝胶成像分析系统行灰度分析。

**1.2.3 细胞黏附检测** 采用改良 MTT 比色法行细胞黏附检测。给药方法同细胞活性检测部分, 分组给药后孵育 48h, 胰酶消化使细胞悬浮于不含胎牛血清的 DMEM 培养基, 将细胞接种于覆盖有纤维连接蛋白的 96 孔板中

(2×10<sup>4</sup>/mL, 100μL/孔), 使细胞贴壁 30min, PBS 轻柔清洗 2 次, 加入含有 MTT(5mg/mL, 20μL; Sigma, USA) 的培养基, 孵育 4h, 弃去上清, 加入 150μL 100% DMSO 震荡 10min, 酶标仪读取波长 550nm 处吸光度。每组测试 8 孔取均数。

统计学分析: 采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞活性** 与 C 组相比, NPs 组各观察时间点细胞成活率无差异(*P*>0.05), 而所有 Zeb 给药组在 4 个时点细胞成活率均降低(*P*<0.05)。游离 Zeb 和荷载 Zeb 的 MePEG-PCL NPs 对细胞活性的抑制均呈剂量依赖性增强(*P*<0.05)。与游离组相比相同剂量荷载 Zeb 的 MePEG-PCL NPs 组在给药 12h 时细胞活性无差异, 而给药 24, 48, 96h 后载体组细胞活性降低(*P*<0.05), 见表 1, 图 1。

**2.2 细胞凋亡** 给药后 96h, C 组、NPs 组、ZebF1 组未出现 DNA 碎片表达, ZebF2, ZebNP1, ZebNP2, 组出现 DNA 碎片表达, 其表达强度依次为 ZebNP2> ZebNP1> ZebF2> ZebF1=C=NPs 组(表 2, 图 2, 3)。

**2.3 细胞黏附性** 与 C 组相比, NPs 组细胞黏附率无差异(*P*>0.05), 所有 Zeb 给药组细胞黏附率均降低, 与游离组相比同剂量载体组细胞黏附率降低(表 3, 图 4)。

## 3 讨论

后发性白内障是白内障囊外摘除联合后房型人工晶状体植入术后最常见的并发症,也是术后视力再次下降的主要原因,近年来随着手术技术和晶状体材质的改善,虽然 PCO 的发生率有所降低,但是文献报道其在婴儿和青少年患者术后 1a 的发病率高达 100%,而在成人患者术后 2~5a 的发病率也高达 20%~40%,严重影响患者的术后视力<sup>[1]</sup>。目前主要采用 Nd:YAG 激光后囊膜切开术治疗 PCO,但其存在视网膜脱离、黄斑囊样水肿、人工晶状体损伤和前葡萄膜炎等多种严重并发症的风险,因此探索更为有效的预防和治疗 PCO 的措施成为目前研究的热点。

关于 PCO 形成的原因,目前公认的主要机制是术后残留的晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)增生、黏附、移行和上皮间质转分化。研究显示多种细胞因子比如 IL-1, TNF, TGF-β 激活细胞内多种信号传导通路,例如 Smads 信号通路, PI3K/AKT 信号通路, MAPK 信号通路等,在 PCO 的发生发展中起到重要地位。基因表观遗传的修饰发生在转录后,不改变基因的 DNA 结构,是可逆的过程,因此理论上为纤维化疾病的治疗带来新的作用靶点。基因表达的表观遗传改变主要发生在 DNA 的甲基化及组蛋白乙酰化两个水平。

Zebularine([1-(β-D-呋喃核糖苷)-1,2-二氢嘧啶-2-酮])是一种新型的抗肿瘤药物,可以与 DNA 甲基转移酶共价结合抑制其活性,因为其性质稳定,低毒,对肿瘤细胞的高度选择性等显著优势成为研究热点。Zhou 等<sup>[3,4]</sup> 研究显示 Zebularine 通过拮抗 DNA 甲基化转移酶 1(DNMT1)的作用,抑制磷酸化 AKT/PKB(Ser473)、p44/42 MAPK 信号通道等机制抑制晶状体上皮细胞增殖、移行、纤维化过程,从而起到预防和治疗 PCO 的作用。

表1 MTT 法细胞活性观察

检测时间	ZebF1 组	ZebF2 组	ZebNP1 组	ZebNP2 组	NPs 组	C 组
12h	92.3±4.1 <sup>a</sup>	79.3±5.5 <sup>a,c</sup>	90.8±4.8 <sup>a</sup>	80.5±5.2 <sup>a,e</sup>	99.1±2.1	98.2±4.3
24h	71.6±5.7 <sup>a</sup>	53.6±4.2 <sup>a,c</sup>	55.9±5.2 <sup>a,e</sup>	38.5±4.4 <sup>a,c,e</sup>	97.3±3.8	97.5±2.5
48h	66.9±4.6 <sup>a</sup>	49.3±5.4 <sup>a,c</sup>	39.4±3.6 <sup>a,e</sup>	28.8±6.0 <sup>a,c,e</sup>	95.6±4.9	96.4±3.8
96h	63.8±3.3 <sup>a</sup>	45.8±3.1 <sup>a,c</sup>	35.1±5.7 <sup>a,e</sup>	22.6±4.2 <sup>a,c,e</sup>	94.4±5.2	95.0±4.6

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs C 组; <sup>c</sup>*P*<0.05; ZebF2 组 vs ZebF1 组/ ZebNP2 组 vs ZebNP1 组; <sup>e</sup>*P*<0.05 vs 同剂量 ZebF 组。

表2 DNA Ladder 灰度分析

观测指标	ZebF1 组	ZebF2 组	ZebNP1 组	ZebNP2 组	NP 组	C 组
OD	179±31	135±34 <sup>a,c</sup>	101±30 <sup>a,e</sup>	42±24 <sup>a,c,e</sup>	187±32	193±25

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs C 组; <sup>c</sup>*P*<0.05; ZebF2 组 vs ZebF1 组/ ZebNP2 组 vs ZebNP1 组; <sup>e</sup>*P*<0.05 vs 同剂量 ZebF 组。

表3 改良 MTT 法细胞黏附性观察

观测指标	ZebF1 组	ZebF2 组	ZebNP1 组	ZebNP2 组	NPs 组	C 组
OD	0.30±0.03 <sup>a</sup>	0.21±0.09 <sup>a,c</sup>	0.17±0.04 <sup>a,e</sup>	0.03±0.03 <sup>a,c,e</sup>	0.45±0.05	0.44±0.08

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs C 组; <sup>c</sup>*P*<0.05; ZebF2 组 vs ZebF1 组/ ZebNP2 组 vs ZebNP1 组; <sup>e</sup>*P*<0.05 vs 同剂量 ZebF 组。

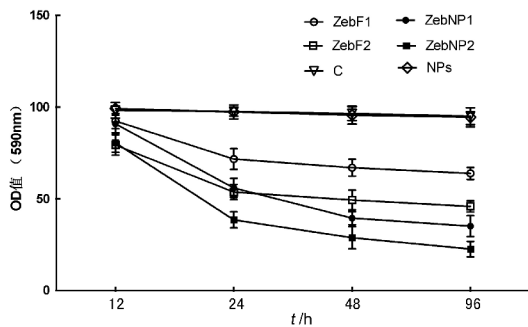


图1 Zebularine 抑制 HLE B-3 细胞增殖的时间依赖性和剂量依赖性。

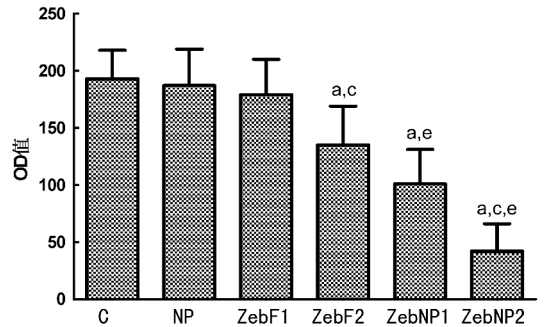


图3 Zebularine 对 HLE B-3 细胞凋亡的影响 <sup>a</sup>*P*<0.05 vs C 组; <sup>c</sup>*P*<0.05; ZebF2 组 vs ZebF1 组/ ZebNP2 组 vs ZebNP1 组; <sup>e</sup>*P*<0.05 vs 同剂量 ZebF 组。

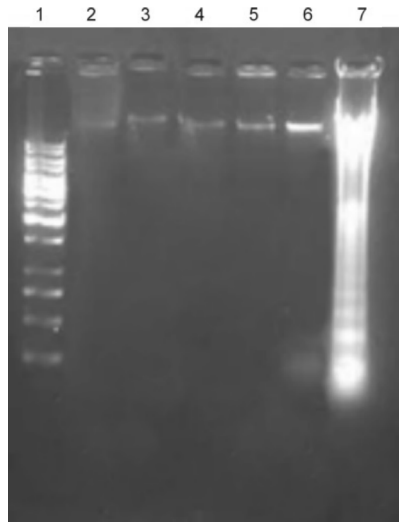


图2 DNA ladder 细胞凋亡观察 注:1: Marker; 2: C 组; 3: NPs 组; 4: ZebF1 组; 5: ZebF2 组; 6: ZebNP1 组; 7: ZebNP2 组。

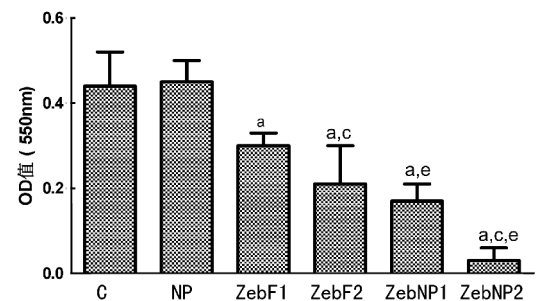


图4 Zebularine 对 HLE B-3 细胞黏附性的影响 <sup>a</sup>*P*<0.05 vs C 组; <sup>c</sup>*P*<0.05; ZebF2 组 vs ZebF1 组/ ZebNP2 组 vs ZebNP1 组; <sup>e</sup>*P*<0.05 vs 同剂量 ZebF 组。

本实验发现 Zeb 可剂量依赖性地抑制体外培养的 HLE B-3 细胞活性,降低细胞黏附性,引起 HLE B-3 凋亡。荷载 Zeb 的 MePEG-PCL NPs 对 HLE B-3 细胞的毒性和抑制黏附作用较游离药物增强。说明 MePEG-PCL 可延长并增强 Zeb 的细胞毒性和黏附抑制作用。而空载的 MePEG-PCL 对细胞活性、黏附性无影响,亦不引起 HLE B-3 凋亡,因此无细胞毒性作用。

Zeb 作为一种新型的抗肿瘤药物,可以通过抑制 DNA 甲基化过程,显著抑制肿瘤细胞增殖分化和转移,在有效抑制肿瘤增殖的同时对细胞或机体的损害却很小<sup>[7]</sup>。已有研究表明 Zeb 可通过抑制 TGF-β 诱导的晶状体上皮细胞向肌纤维母细胞的分化而起到抑制后发性白内障形成的作用<sup>[3]</sup>。本研究发现 Zeb 对体外培养的晶状体上皮细胞的活性和黏附性具有剂量依赖性的抑制作用。Zeb 诱导了晶状体上皮细胞的凋亡。说明了 Zeb 在预防后发性白内障具有潜在的临床意义。

目前眼部无创给药中的研究仍主要集中在增加药物的生物利用度和控释给药上。普通眼药水中只有约 1% ~ 3%



的药物可以有效透过角膜到达眼内组织<sup>[8]</sup>。研究表明使用载药纳米微粒药物点眼后,与同剂量的水溶液比较可明显增加角膜和房水中的药物含量,延长作用时间,减少全身副作用。将纳米制剂与凝胶或原位凝胶制剂复合制备成复合体系,是目前无创式眼部纳米给药系统研究的热点方向之一<sup>[9]</sup>。凝胶基质的黏膜附着能力使得纳米制剂可以与角膜紧密接触,进一步延长接触时间,增强药物的吸收。胶束粒径较小,易于被角膜细胞摄取。胶束制备用料少,不需额外添加其他辅料,因此安全性相对较高<sup>[10]</sup>。本实验研究发现空载 MePEG-PCL 对体外培养的晶状体上皮细胞的活性、黏附性均无影响,说明将该载体用于眼部用药具有一定的安全性。然而将该载体荷载 Zeb 后使得 Zeb 对晶状体上皮细胞的黏附性的降低程度均显著强于游离药物,对细胞活性的抑制时间显著长于游离药物。本实验结果为下一步在体实验提供了依据。

荷载 Zeb 的 MePEG-PCL NPs 可有效地抑制体外培养的晶状体上皮细胞的活性、黏附性,造成细胞的凋亡,其效果优于同剂量的游离药物,本研究为临床后发性白内障的治疗提供新思路。

#### 参考文献

1 Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated. *Arch Ophthalmol* 2009;127(4):555-562

2 Awasthi N, Wang-Su ST, Wagner BJ. Downregulation of MMP-2 and -9 by proteasome inhibition: a possible mechanism to decrease LEC migration and prevent posterior capsular opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(5):1998-2003

3 Zhou P, Lu Y, Sun XH. Zebularine suppresses TGF-beta-induced lens epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation by inhibiting MeCP2. *Mol Vis* 2011;17:2171-2123

4 Zhou P, Lu Y, Sun XH. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor Zebularine on human lens epithelial cells. *Mol Vis* 2012;18:22-28

5 Yavuz B, Pehlivan SB, Unlu N. Dendrimeric systems and their applications in ocular drug delivery. *Scientific WorldJournal* 2013; 2013:732340

6 Guha R, Chowdhury S, Palui H, et al. Doxorubicin-loaded MePEG-PCL nanoparticles for prevention of posterior capsular opacification. *Nanomedicine(Lond)* 2013; 8(9):1415-1428

7 Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, et al. Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* 2004; 6(2):151-158

8 Urtti A, Salminen L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. *Surv Ophthalmol* 1993; 37(6):435-456

9 Gan L, Wang J, Jiang M, et al. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov Today* 2013; 18(5-6):290-297

10 Hosny KM. Ciprofloxacin as ocular liposomal hydrogel. *AAPS PharmSciTech* 2010; 11(1):241-246