

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.08.049

三氧化二砷对视网膜色素上皮细胞增殖的影响*

曲艺欣 王 峰 姜成功 陈敬丽 刘宏涛 苏 颖[△]

(哈尔滨医科大学附属第一临床医院眼科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial cell, RPE)在维护视网膜正常生理功能方面具有极其重要的作用。研究发现,视网膜色素上皮细胞是增殖性玻璃体视网膜疾病(proliferative vitreous retinopathy, PVR)发生发展的主要细胞,而其增殖与细胞内调控信息失调密切相关。多项研究成果表明,三氧化二砷(As_2O_3)已经被用于医药几千年。其在白血病治疗的使用早在一个世纪以前就有所描述。 As_2O_3 在医学上的作用有着悠久的历史。然而,在最近的几个世纪它几乎被遗忘在西方医学。三氧化二砷在白血病、肿瘤的基础研究与临床治疗中已取得较大进展,引起广泛关注,但在眼科领域的研究才刚刚起步。增殖性视网膜疾病的发病日趋严重,已经成为全球性的重大负担,此病所导致的眼部并发症严重影响患者视功能及生活质量,因此,有必要就三氧化二砷对视网膜色素上皮细胞增殖的作用进行综述,以期对眼科疾病的防治研究工作提供新的思路和策略。

关键词:三氧化二砷; 视网膜色素上皮细胞; 细胞增殖; 综述

中图分类号:R775.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)08-1598-03

Arsenic Trioxide Effects on Retinal Pigment Epithelial Cell Proliferation*

QU Yi-xin, WANG Feng, JIANG Cheng-gong, CHEN Jing-li, LIU Hong-tao, SU Ying[△]

(The First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT: Retinal pigment epithelial cells (RPE) have an extremely vital role in maintaining normal retinal physiological function. Researches have found that retinal pigment epithelial cells are the main cells for the development of proliferative vitreous retinopathy (PVR). A number of studies have demonstrated that arsenic trioxide (As_2O_3) has been applied in medicine for thousands of years. Its use in leukemia treatment are described as early as a century ago. However, in recent centuries, it is almost forgotten in western medicine. Although the basic and clinical research on arsenic trioxide in leukemia and cancer has made great progress and get extensive attention, the research in the eye field has just started. Hyperplastic diseases of retina disease has become increasingly serious. It has become a major global burden. The ocular complications it caused seriously affect the patient's visual function and quality of life. Therefore, it is necessary to review the proliferation role of arsenic trioxide on the retinal pigment epithelial cell so as to provide new ideas and strategies for the prevention and control of the eye disease.

Key words: Arsenic Trioxide; Retinal Pigment Epithelial Cells; Cell Proliferation; Review

Chinese Library Classification(CLC): R775.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2015)08-1598-03

增殖性玻璃体视网膜疾病 (proliferative vitreous retinopathy, PVR) 是眼外伤、糖尿病及炎症性、血管性等视网膜病变的一种重要并发症,对视力的危害较大,在全球范围内已经成为主要的致盲眼病之一,严重影响了人们的生活质量,迄今为止,尚无有效治愈方法。近几年研究表明,视网膜色素上皮细胞^[5,6]是一种静止细胞,生理状态下不增殖,但当其受到病理性损伤刺激后,RPE 细胞则会发生趋化、迁移和增殖,且易转化为成纤维样细胞并分泌胶原,形成机化膜,因此成为参与 PVR 的主要细胞。三氧化二砷(As_2O_3)是砒霜中的主要有效成分^[1,2],是一种细胞毒性药物,多年以来被作为一种致癌物质,干扰细胞代谢,可致细胞内一些主要的酶失活,能抑制细胞 DNA 的合成,引起多种肿瘤细胞的多种基因表达发生改变。张鹏等应用 As_2O_3 治疗急性早幼粒细胞白血病取得了较大进步,有效率为

73.3%,且无明显的毒副作用,因此受到广泛关注。本研究以人 RPE 细胞株为靶系统,借助 As_2O_3 的生物学特性,探讨其对 RPE 细胞增殖的影响。

真核生物细胞周期^[21-25]的调控有赖于细胞周期素依赖性激酶(CDK)的活化,周期素(cyclin)是 CDK 的正调节因子,活化 CDK 活性;CDK 抑制剂(CDKI)则是负调节因子,使 CDK 失活。目前所知的对 CDK 具有广谱抑制作用的 CDKI 包括 p21、p27 和 p57。

增殖细胞核抗原 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 由 Miyachi 等于 1978 年在系统性红斑狼疮患者的血清中首次发现,因其存在于正常增殖细胞及肿瘤细胞内而得名,其与细胞内 DNA 合成与细胞增殖的启动上起到较为重要作用,亦是研究者评价细胞增殖状态较为重要的指标。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81100659)

作者简介:曲艺欣(1986-),女,硕士研究生,研究方向:青光眼,电话:0451-85555661, E-mail:quyixin2010020644@126.com

△ 通讯作者:苏颖, E-mail:wangfd@126.com

(收稿日期:2014-06-17 接受日期:2014-07-13)

1 p27 基因的生物学特征

p27 基因^[1]定位于第 12 号染色体短臂 1 区 3 带(12p13),其编码的蛋白质含有 198 个氨基酸,相对分子质量约 27KD,由 2 个外显子和 2 个内含子组成,是一种调控细胞周期并抑制细胞分裂的重要基因。P27 蛋白质 C 端有 2 个分开的核定位信号,N 端没有结构锌指的结构域。因 p27 主要是与 cyclin 结合,因此可发挥对 cyclin-CDK 的抑制功能,其生物学功能如下:(1) 其可直接的抑制 cyclin-CDK 复合物的生物活性,从而抑制细胞由 G1 期向 S 期的转变,同时 P27 亦可调控细胞周期。(2) 促进细胞的分化,刺激细胞间的黏附和细胞凋亡。研究者发现,缺氧可诱导 p27 的产生,阻碍细胞周期,因其可抑制 CDK2 的活性,如下调 p27 的表达将解除缺氧所致 G1 期的阻滞,也有文献报道 p27 可抑制细胞凋亡。p27 诱导可抑制细胞凋亡,可能与细胞种类、生长方式与状态及其是否恶性化关系密切。(3) 还与细胞的衰老有相关性。文献记载,p27 表达量下降对 T 细胞的发育、增殖和免疫反应是至关重要的,由于 CD4 与 CD8-的胸腺细胞和激活成熟 T 细胞中 p27 表达量下降,而当使 p27 的表达上调后会引起胸腺细胞生成障碍和成熟 T 细胞增殖活力下降。

2 p27 与细胞周期

p27^[3,4] 主要与 cyclin 结合而发挥对 cyclin-CDK 的抑制作用。p27 对 CDK 的抑制作用有两方面,一方面 p27 也可以抑制 CDK 的激活过程,最终抑制细胞周期 G1/S 的转变,故目前认为其是一个肿瘤抑制因子;另一方面 p27 能抑制已结合到 cyclin 并被激活的 CDK 活性。研究者把 p27 基因构建入腺病毒载体中,使小鼠的星形胶质细胞高表达此构建载体,发现其增殖明显被抑制,而且还发现瘤细胞快速的增殖与 p27 短暂的低表达有较为密切的关系。

3 PCNA 的分子结构

增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)^[10-13] 存在于所有正常增殖细胞及肿瘤细胞核内,PCNA 分子量在 33KD-36KD 之间。它的 mRNA 为 1.3Kb。人的 PCNA 基因包含 9461 个碱基对,有 6 个外显子,内含子之间和内含子与外显子之间存在着较多的重复序列。从人 PCNA 中 cDNA 序列可推知人 PCNA 蛋白内有 261 个氨基酸,其中酸性氨基酸的数量明显多于碱性氨基酸;N 端前 18 个氨基酸的排列与兔 PCNA 蛋白 N 端前 18 个氨基酸的排列相同。5' 端侧翼具有促进子的生物活性。PCNA 基因是比较保守的基因。在哺乳类动物、植物和病毒中都有表达。

4 PCNA 的生物学特征

PCNA 存在于细胞核内^[14-18],也在核内合成,不是从细胞胞浆进入细胞核内。因 PCNA 蛋白含有较多酸性氨基酸,所以等电点偏酸性,pH 约为 4.8-4.9。当使 PCNA 蛋白加热到 56℃ 且 30 分钟后可使其生物性失去活性。因 PCNA 对胰蛋白酶比较敏感,能被此酶消化,而且不被 DNA 和 RNA 酶所破坏。免疫组化技术已证明 PCNA 有两种类型:不溶性 PCNA 和可溶性

PCNA。(1)不溶性 PCNA 与特定的细胞核结构相关。不易被甲醇破坏,也不易被去污剂洗脱。在 S 期其表达量有较明显不同,免疫荧光方法已证实只有这种类型 PCNA 与 DNA 复制位点有相关性,表明不溶性 PCNA 在 DNA 复制中有较为重要的功能。(2) 可溶性 PCNA 在增殖和静止细胞中均有表达,与 DNA 的结合较为松散,也有可能在细胞核内游离,经甲醇处理过的组织和细胞,未见 PCNA 的表达,也可被去污剂提取,在细胞周期中,这种类型 PCNA 的表达未见变化。

5 PCNA 的生理作用

正常增殖的细胞和转化的细胞中,PCNA 的表达量有明显的不同,多项试验技术均已证实,PCNA 是 SV40 病毒 DNA 体外复制所必需的。大多数细胞中 Go-G1 期未见 PCNA 的表达,但 G1 晚期,PCNA 的表达量有明显的增加,而 S 期达到高峰,G2-M 期又有所下降,其量的变化与 DNA 的合成相同。PCNA 在 DNA 前导链和后随链的合成中起协助作用。又有相关研究证明 PCNA^[19,20] 与 DNA 聚合酶 δ 的附属蛋白为同一种物质。因为,(1) 二者都能被抗 PCNA 抗体结合与识别;(2) 经电泳检测,两者结果相同;(3) 两者作用相同。都能增强 SV40DNA 体外复制和小牛胸腺 DNA 聚合酶已的增加作用;(4) 他们末端氨基酸序列是一致的。

6 As₂O₃ 与细胞增殖

三氧化二砷是一种毒性物质,小剂量口服砷剂即会产生胃肠道、肝脏毒性等不良反应。症状主要表现为胃肠道大量出血及肝脏损伤等。经静脉注射纯化的砷剂却未见严重的不良反应。近年来多项研究表明,As₂O₃ 有抑制细胞增殖的潜能,对多种人类增殖细胞都有影响,且对肿瘤也有抑制作用,为细胞增殖性及肿瘤疾病的治疗提供了新的思路和策略^[9]。

伍钢等应用四甲基偶氮唑蓝法于体外观察 As₂O₃ 对神经母细胞瘤细胞株 SJ-N-SH 增殖的影响。研究结果表明 0.5~4 $\mu\text{mol/L}$ 的三氧化二砷能够明显抑制 SJ-N-SH 细胞的增殖。肖冬梅等研究发现,As₂O₃ 通过延长细胞周期而抑制 K562 细胞生长:在 1 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 作用下,K562 细胞生长受到明显抑制。通过以上文献报道,As₂O₃ 对细胞增殖有一定的抑制作用,值得我们做进一步的研究。

7 展望

As₂O₃ 在实际应用中有许多问题需要考虑,如怎样控制 As₂O₃ 毒副作用,使 As₂O₃ 只作用于靶细胞而不影响眼部其他细胞;探讨最安全有效的给药途径和剂量,但随着分子生物学的迅速发展和分子生物学技术的广泛应用,研究必将更加深入,机制会更加明了。就目前文献上得到的研究成果分析,As₂O₃ 的治疗作用在眼科的应用前景很广泛,如果 As₂O₃ 在眼科的治疗取得成功,这将是人类防盲致盲的又一大进步。

参考文献(References)

- [1] Wai-Pui Tse, Christopher H.K. Cheng, Chun-Tao Che, et al. Arsenic Trioxide, Arsenic Pentoxide, and Arsenic Iodide Inhibit Human Keratinocyte Proliferation through the Induction of Apoptosis[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2008, 326

- (2): 388-394
- [2] Jeong Hun Kim, Jin Hyoun Kim, Young Suk Yu, et al. Antitumor Activity of Arsenic Trioxide on Retinoblastoma: Cell Differentiation and Apoptosis Depending on Arsenic Trioxide Concentration [J]. IOVS, 2009, 50(4): 1819-1823
- [3] Jeong Goo Lee, EunDuck P Kay. Involvement of Two Distinct Ubiquitin E3 Ligase Systems for p27 Degradation in Corneal Endothelial Cells[J]. IOVS, 2008, 49(1): 189-196
- [4] Wang F, Qi LX, SuY, et al. Inhibition of cell proliferation of Tenon's capsule fibroblast by S-phase kinase-interacting protein 2 targeting SiRNA through increasing p27 protein level [J]. IOVS, 2010, 51(3): 1475-1482
- [5] Chen X, Liu Y, Jiang Z, et al. Proteinkinase C α downregulation via siRNA-PKC α released from foldable capsular vitreous body in cultured human retinal pigment epithelium cells [J]. IOVS, 2011, 6: 1303-1311
- [6] 许光军, 张学东. S100a7 蛋白在体外培养人视网膜色素上皮细胞中的表达及功能 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(37): 1673-8225
- Xu Guang-jun, Zhang Xue-dong. S100a7 protein in vitro culture expression and function in human retinal pigment epithelial cells[J]. China Tissue Engineering Research and Clinical Rehabilitation, 2011, 15(37): 1673-8225
- [7] Yang Jian-gang, Sun Nai-xue, Cui Li-jun, et al. Adenovirus- mediated delivery of p27KIP1 to prevent wound healing after experimental glaucoma filtration surgery [J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(4): 413-423
- [8] Huang Yu-kan, Zhang Ming-chang, Wang Yong, et al. Effect of p27Kip1 Inhibition on Proliferation of Bovine Corneal Endothelial Cells by RNA Interference [J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2008, 28(2): 211-215
- [9] 杨超, 夏之柏, 陈昆, 等. 三氧化二砷体外抑制人星形细胞瘤细胞增殖及诱导凋亡的研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2009, 35(11): 677-679
- Yang Chao, Xia Zzhi-bai, Chen Kun, et al. Arsenic trioxide inhibited human astrocytoma cells in vitro proliferation and induce the apoptosis of research [J]. Chinese Journal of Neural Mental Illness, 2009, 35(11): 677- 679
- [10] Lee KY, Fu H, Aladjem MI, et al. ATAD5 regulates the lifespan of DNA replication factories by modulating PCNA level on the chromatin[J]. J Cell Biol, 2013, 200(1): 31-44
- [11] Hibbert RG, Sixma TK. Intrinsic flexibility of ubiquitin on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in translesion synthesis[J]. J Biol Chem, 2012, 287(46): 39216-39223
- [12] Ghosal G, Leung JW, Nair BC, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding protein Clorf124 is a regulator of translesion synthesis[J]. J Biol Chem, 2012, 287(41): 34225-34233
- [13] Bouayad D, Pederzoli-Ribeil M, Mocek J, et al. Nuclear-to-cytoplasmic relocation of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) during differentiation involves a chromosome region maintenance 1 (CRM1)-dependent export and is a prerequisite for PCNA antiapoptotic activity in mature neutrophils [J]. J Biol Chem, 2012, 287(40): 33812-33825
- [14] Fan H, Suzuki T, Ogata M, et al. Expression of PCNA, ICAM-1, and vimentin in lens epithelial cells of cataract patients with and without type 2 diabetes[J]. Tokai J Exp Clin Med, 2012, 37(2): 51-56
- [15] Gali H, Juhasz S, Morocz M, et al. Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(13): 6049-6059
- [16] Punchihewa C, Inoue A, Hishiki A, et al. Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication[J]. J Biol Chem, 2012, 287(17): 14289-300
- [17] Mahler M, Miyachi K, Peebles C, et al. The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) [J]. Autoimmun Rev, 2012, 11(10): 771-775
- [18] Fox JT, Lee KY, Myung K. Dynamic regulation of PCNA ubiquitylation/ deubiquitylation[J]. FEBS Lett, 2011, 585(18): 2780-2785
- [19] Sun B, Zhao S, Zhou C, et al. Detection of PD4, CD44, PCNA protein and its clinical significance in human laryngeal carcinoma[J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2010, 24(18): 817-819
- [20] Xu B, Hua J, Zhang Y, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) regulates primordial follicle assembly by promoting apoptosis of oocytes in fetal and neonatal mouse ovaries [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16046
- [21] Velez G, Weingarden AR, Lei H, et al. Inhibits Proliferative Vitreoretinopathy in Fibroblast and Genetically Modified Muller Cell-Induced Rabbit Models [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(2): 1392-1397
- [22] Wladis EJ, Falk NS, Iglesias BV, et al. Analysis of the molecular biologic milieu of the vitreous in proliferative vitreoretinopathy[J]. Retina, 2013, 33(4): 807-811
- [23] Saxena S, Jain A, Akduman L. Vitreopapillary and vitreomacular traction in proliferative Eales' disease[J]. BMJ Case Rep, 2012, 33(4): 807-811
- [24] Kuhn F, Teixeira S, Pelayes DE. Late versus prophylactic choriorretinectomy for the prevention of trauma-related proliferative vitreoretinopathy[J]. Ophthalmic Res, 2012, 48(1): 32-37
- [25] Umazume K, Barak Y, McDonald K, et al. Proliferative vitreoretinopathy in the Swine-a new model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(8): 4910-4916