

引文格式:葛佳佳,苏胜,刘平.地塞米松对人晶状体上皮细胞中波形蛋白表达的影响[J].眼科新进展,2015,35(5):413-415. doi:10.13389/j.cnki.rao.2015.0112

【实验研究】

地塞米松对人晶状体上皮细胞中波形蛋白表达的影响[△]

葛佳佳 苏胜 刘平

Effects of dexamethasone on vimentin in human lens epithelial cells

GE Jia-Jia, SU Sheng, LIU Ping

【Key words】 dexamethasone; vimentin; steroid-induced cataract; human lens epithelial cell

【Abstract】 Objective To study the effects of dexamethasone (Dex) on vimentin in human lens epithelial cells (HLEC), and investigate the role of vimentin expression in steroid-induced cataract (GIC) formation. Methods HLEC were passaged and exposed to DMEM (control group) and DMEM + 1 μmol · L⁻¹ Dex (Dex group) for 7 days. Real-time PCR and Western-blot were applied to identify the expression of vimentin at protein and transcription levels, the distribution and expression of vimentin in HLEC were measured by immunofluorescence staining. Results Real-time PCR results showed that the expression of vimentin mRNA in Dex group was lower than that in control group (P < 0.05). Western-blot results showed that the expression of vimentin protein in Dex group was lower than that in control group (P < 0.05), which suggested that Dex could reduce the expression of vimentin. Immunofluorescence staining showed that the expression of vimentin in Dex group was lower than that in control group, which was consistent with the Western-blot results. Conclusion Dex can reduce the expression of vimentin in HLEC, which may cause abnormal proliferation and differentiation of HLEC, eventually leading to the formation of GIC.

【关键词】 地塞米松;波形蛋白;激素性白内障;晶状体上皮细胞

【摘要】 目的 探讨地塞米松(dexamethasone, Dex)对人晶状体上皮细胞系(human lens epithelial cells, HLEC)中波形蛋白表达的影响以及波形蛋白表达变化在糖皮质激素性白内障形成中的作用。方法 对HLEC进行传代培养,应用DMEM和DMEM + 1 μmol · L⁻¹ Dex作用于HLEC 7 d,采用实时PCR和Western-blot从基因水平和蛋白水平检测波形蛋白的表达变化,采用免疫荧光染色法检测波形蛋白在细胞中的分布及表达变化。结果 实时PCR结果显示,Dex组较对照组波形蛋白mRNA表达减少,组间差异有统计学意义(P < 0.05)。Western-blot检测结果显示,Dex组较对照组波形蛋白含量减少,组间差异有统计学意义(P < 0.05),提示Dex可降低波形蛋白的表达。免疫荧光染色结果显示Dex组较对照组波形蛋白表达减少,与Western-blot检测结果一致。结论 Dex可诱导HLEC中波形蛋白表达减少,从而引起HLEC异常的增殖和分化,最终导致糖皮质激素性白内障的形成。

作者简介:葛佳佳,女,1988年2月出生,在读医学硕士。研究方向:白内障的基础研究。联系电话:18704633801; E-mail: 876074858@qq.com

About GE Jia-Jia: Female, born in February, 1988. Master degree. Tel: 18704633801; E-mail: 876074858@qq.com

收稿日期:2014-10-15
修回日期:2014-12-25

本文编辑:付中静

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:30973275);高等学校博士学科点专项科研基金资助(编号:20112307110013)

作者单位:150001 黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

通讯作者:刘平, E-mail: pingliuhmu@126.com

Received date: Oct 15, 2014

Accepted date: Dec 25, 2014

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 30973275); Specialized Research Fund for Doctoral Program of Higher Education (No: 20112307110013)

From the Eye Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Responsible author: LIU Ping, E-mail: pingliuhmu@126.com

长期全身或局部使用糖皮质激素可引起晶状体后囊下混浊 (posterior subcapsular opacities, PSO), 称为糖皮质激素性白内障 (glucocorticoid-induced cataract, GIC)^[1]。有关 GIC 的发病机制有多种假说, 但都不能很好地解释 PSO 的形成过程, 因而在预防和治疗上尚无有效手段。激素可能通过其受体介导的波形蛋白 (Vimentin) 的改变影响晶状体上皮细胞增殖和分化, 最终导致 GIC 的形成。因此, 研究波形蛋白对晶状体上皮细胞增殖和分化的影响, 可能是 GIC 发病机制研究的一个新方向。本研究拟通过观察地塞米松 (dexamethasone, Dex) 对人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, HLEC) 系中波形蛋白表达的影响, 探讨波形蛋白改变在 GIC 发病机制特别是 PSO 形成过

程中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 HLEC 购于美国细胞库 (ATCC), 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco), Dex (美国 Sigma), 逆转录试剂盒、实时 PCR 试剂盒、QPCR 仪、PCR 仪 (美国 Life 公司), 鼠抗人 Vimentin IgG、兔抗小鼠 IgG (美国 Santa Cruz 公司), SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (碧云天试剂公司), 酶标仪 (美国 Bio Rad), EVOS 倒置荧光显微镜 (美国 AMG 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HLEC 体外培养与分组 HLEC 培养于 DMEM 培养基中: 含体积分数 20% 胎牛血清, 100

U · L⁻¹青霉素,100 U · L⁻¹链霉素,584 mg · L⁻¹谷氨酰胺。实验分为两组:激素组(Dex组):DMEM + 1 μmol · L⁻¹Dex;对照组(Con组):DMEM。分别作用于细胞7 d,每2 d换液1次,细胞融合后用胰蛋白酶消化,按1:2传代。

1.2.2 实时 PCR 检测波形蛋白 mRNA 表达情况

细胞总 RNA 的提取和实时 PCR 反应按照经典的方法进行^[1]。Vimentin 的上游引物:5'-ACCGCTTT-GCCAACTACAT-3',下游引物:5'-GTCCCCGCTCCAC-CTC-3'。应用 GAPDH 作为内参。GAPDH 的上游引物:5'-CAACTTTGCTATCGTGAAGGACT-3',下游引物:5'-CGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'。

1.2.3 Western-blot 检测波形蛋白表达情况 (1)

细胞总蛋白的提取:消化各组细胞,加入细胞裂解液和去蛋白酶涡旋、超声破碎,离心后取上清液 100 μL 测蛋白浓度,取蛋白上清液,加入 SDS-PAGE 蛋白上清液,100 °C 煮 5 min 后分装于 EP 管中,-80 °C 冰箱保存。(2)Western-blot 检测:取蛋白样品,加样进行 SDA-PAGE 凝胶电泳,湿转膜至硝酸纤维素膜(NC 膜)上,将 NC 膜放于封闭液中 4 °C 过夜。室温下 1 h,加入一抗(鼠抗人 Vimentin 抗体和鼠抗人 GAPDH 抗体,1:1000),室温振荡 4 h,TBST 冲洗 5 次,每次 7 min;加入二抗(兔抗鼠 IgG,1:1000)室温振荡 2 h,TBST 冲洗 5 次,每次 7 min。碱性磷酸酶显色试剂盒显色,凝胶成像系统照相。

1.2.4 免疫荧光染色检测 Dex 对波形蛋白表达及分布的影响

将细胞消化传代到激光共聚焦培养皿中,继续培养 12 h,PBS 洗片 2 次,每次 10 min;40 g · L⁻¹多聚甲醛溶液室温固定 15 ~ 20 min,PBS 洗片 3 次;2 g · L⁻¹ Troton X-100 透化细胞 7 min,40 g · L⁻¹ BSA 封闭 1 h;以 1:400 鼠抗人 Vimentin 抗体孵育过夜,PBS 洗片 3 次,每次 5 min;1:400 荧光二抗室温避光孵育 30 min,PBS 洗片 3 次。荧光显微镜下观察波形蛋白的表达。

1.2.5 图像采集与分析

实时 PCR 通过 Quantity One 程序对结果进行统计,得到各组 PCR 的 CT 值,采用^{ΔΔ}Ct 法计算基因表达的强弱。Western-blot 图片扫描后,经 Image J 程序对条带中心密度进行测定。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。所有实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时 PCR 结果

对照组和 Dex 组 HLEC 波形蛋白 mRNA 的表达情况见图 1,将 CT 值比值(Vimentin/GAPDH)作为波形蛋白 mRNA 的相对表达量,组间差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 Dex 可降低波形蛋白 mRNA 的表达。

Figure 1 Real-time PCR and Western-blot were applied to identify the expression of vimentin at protein and transcription levels in HLEC exposed to Dex. A: After Dex induced for 7 days, vimentin mRNA expression in HLEC was decreased ($P < 0.05$); B: After Dex induced for 7 days, vimentin protein expression was significantly decreased ($P < 0.05$). GAPDH expression had no statistically significant difference between groups ($P > 0.05$) 实时 PCR 和 Western-blot 检测 Dex 对 HLEC 中波形蛋白 mRNA 及蛋白的影响。A: HLEC 经 Dex 诱导 7 d 后,波形蛋白 mRNA 表达减少,组间差异显著($*P < 0.05$); B: HLEC 经 Dex 诱导 7 d 后,波形蛋白表达量显著性下降,组间差异显著($*P < 0.05$)。GAPDH 在各组表达稳定,组间差异无统计学意义($P > 0.05$)

2.2 Western-blot 检测结果

对照组和 Dex 组 HLEC 波形蛋白的表达情况见图 1B,电泳结果分别为波形蛋白 54 000 和 GAPDH 37 000,GAPDH 在各组表达稳定,差异无统计学意义($P > 0.05$),波形蛋白在各组表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。将灰度值比值(Vimentin/GAPDH)作为波形蛋白的相对表达量,组间差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 Dex 可降低波形蛋白的蛋白表达水平。

2.3 免疫荧光染色检测结果

波形蛋白在 HLEC 中表达分布于胞质中,围绕核周呈辐射状排列,纤维束相互交织成网状结构,并形成大小不等的空泡区,向外周与胞膜相连,其分布范围与细胞外形轮廓一致(图 2)。对照组波形蛋白纤维束粗大、致密,网状结构致密(图 1A);Dex 组波形蛋白纤维束稀疏,纤细,网状结构稀疏(图 2A),均定位于胞质中。结果表明 Dex 组波形蛋白含量减少,与 Western-blot 显示 Dex 组波形蛋白表达下降结果一致。

3 讨论

GIC 是使用激素在眼部发生的主要并发症^[2]。流行病学及临床观察资料相继证实,全身、局部应用激素及激素吸入治疗均可能引起白内障^[3]。GIC 的形成机制有很多假说^[4],主要包括代谢紊乱、渗透压异常、氧化-构象损伤、蛋白聚集物形成、糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)介导的细胞分化异常等学说。研究表明,GR 介导的波形蛋白的变化直接影响晶状体细胞的形态和功能,进而导致 GIC 的形成。

典型的 GIC 表现为晶状体 PSO,主要形态学改变为^[5]:后囊下皮质混浊,病灶边界一般比较清楚,整个外观呈沙石颗粒状;其组织学改变的特征是^[6]:晶状体前囊、前部皮质及核区相对正常,后极部晶状

Figure 2 Expression and distribution of vimentin in HLEC in Dex group and control group under inverted fluorescence microscope (vimentin was green, immunofluorescence, $\times 200$). A: The vimentin fiber bundle in control group was thick with dense mesh structure, the content of vimentin was high; B: The vimentin fiber bundle in Dex group was thin with sparse mesh structure, the content of vimentin was low 倒置荧光显微镜下观察 Dex 组和对照组波形蛋白(Vimentin)在 HLEC 中的表达及分布(绿色荧光代表 Vimentin, 细胞免疫荧光, $\times 200$)。A: 对照组 Vimentin 纤维束粗大、致密, 网状结构致密, Vimentin 含量高; B: Dex 组 Vimentin 纤维束稀疏、纤细, 网状结构稀疏, Vimentin 含量低

体纤维细胞肿胀、排列紊乱、核伸长, 后囊下皮质区可见不同程度圆形病变。

波形蛋白为重要的细胞骨架蛋白, 其在晶状体细胞中适量表达, 对于维持晶状体细胞正常的形态和功能具有重要意义^[7]。有研究表明^[8], 波形蛋白的表达与糖皮质激素及其受体相关。然而, 波形蛋白在晶状体内生物学方面的确切作用是未知的。国内学者首次研究证明 Dex 能降低大鼠晶状体上皮细胞中波形蛋白表达^[9]。本研究也表明地塞米松能显著降低 HLEC 中波形蛋白的表达, 这一结果表明 GR 参与人晶状体波形蛋白的表达水平的改变, 表明 Dex 诱导白内障与波形蛋白表达降低有关。以往的研究还证实了波形蛋白参与晶状体上皮细胞信号转导、细胞结构改变以及细胞分化和凋亡^[10]。由此推测, Dex 诱导的 HLEC 中波形蛋白的表达降低可能影响晶状体上皮细胞结构及功能, 从而导致晶状体透明度的改变^[11]。

糖皮质激素作用于 HLEC 后导致 GR 活化, 随后通过调控有丝分裂原激活蛋白激酶和磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 通路来调控目的基因的表达^[12-13], 进而可能影响诸多细胞功能, 如增殖、分化、凋亡、存活或迁移。所有这些都可能与 GIC 的形成有关。有报道表明, 波形蛋白的表达和活性变化也涉及 PI3K/AKT 和丝裂原激活蛋白激酶两种通路^[14]。本研究证明 Dex 能诱导 HLEC 中波形蛋白表达降低。Dex 可能通过这两种通路来调控, 使波形蛋

白的表达降低, 从而引起 HLEC 异常的增殖与分化, 进而引起 GIC 的形成。

综上所述, 本研究结果已经在基因水平、蛋白水平以及形态学及其分布方面证明, Dex 可诱导 HLEC 中波形蛋白含量减少, 推测 Dex 诱导 GIC 可能机制是通过诱导 GR 介导的波形蛋白含量的减少, 从而导致异常的晶状体上皮细胞分化、信号转导、存活以及凋亡, 最终诱导 GIC 的形成。未来的实验将进一步研究波形蛋白含量变化与激素浓度的关系, 进一步研究 GIC 的具体发病机制, 以便进一步研究 GIC 的预防及药物治疗靶点。

参考文献

- 1 Yang L, Jiang Y, Wu SF, Zhou MY, Wu YL, Chen GQ. CCAAT/enhancer-binding protein alpha antagonizes transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha with direct protein-protein-interaction [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29 (2): 291-298.
- 2 陈华新, 杨磊, 张端莲. 地塞米松对体外大鼠晶状体上皮细胞增殖与分化的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2008, 8 (1): 32-35.
- 3 Ernst P, Baltzan M, Deschênes J, Suissa S. Low-dose inhaled and nasal corticosteroid use and the risk of cataracts [J]. *Eur Respir*, 2006, 27 (6): 1168-1174.
- 4 王建伟, 严宏, 刘兵, 哈文静, 刘永强, 丁正华. 大鼠激素性白内障中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶活性的变化 [J]. *国际眼科杂志*, 2005, 5 (5): 919-921.
- 5 Vasavada AR, Mamidipudi PR, Sharma PS. Morphology of and visual performance with posterior subcapsular cataract [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2004, 30 (10): 2097-2104.
- 6 Lyu J, Kim JA, Chung SK, Kim KS, Joo CK. Alteration of cadherin in dexamethasone-induced cataract organ-cultured rat lens [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (5): 2034-2040.
- 7 徐国兴, 王婷婷. 波形蛋白在老年性白内障晶状体上皮细胞中的表达及其意义 [J]. *眼视光学杂志*, 2002, 4 (4): 215-216.
- 8 Cho SH, Na KS. Haemangioiderelioma on the conjunctiva of the upper eyelid [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2006, 34 (8): 794-796.
- 9 Xie GL, Yan H, Lu ZF. Inhibition of glucocorticoid-induced alteration of vimentin by a glucocorticoid receptor antagonist RU486 in the organ-cultured rat lens [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 32-40.
- 10 Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313 (10): 2050-2062.
- 11 刘平, 苏胜. 白内障蛋白质组学研究的现状及未来研究方向 [J]. *眼科新进展*, 2014, 34 (1): 1-4.
- 12 王林, 刘平. 糖皮质激素受体与糖皮质激素性白内障发病的关系 [J]. *国际眼科杂志*, 2011, 35 (3): 185-187.
- 13 Gupta V, Galante A, Soteropoulos P, Guo S, Wagner BJ. Global gene profiling reveals novel glucocorticoid induced changes in gene expression of human lens epithelial cells [J]. *Mol Vis*, 2005, 11: 1018-1040.
- 14 Nitta T, Kim JS, Mohuczy D, Behrns KE. Murine cirrhosis induces hepatocyte epithelial mesenchymal transition and alterations in survival signaling pathways [J]. *Hepatology*, 2008, 48 (3): 909-919.