

【实验研究】

葛佳佳 苏胜 刘平

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

$U \cdot L^{-1}$ 青霉素, $100 U \cdot L^{-1}$ 链霉素, $584 mg \cdot L^{-1}$ 谷氨酰胺。实验分为两组:激素组(Dex组):DMEM + $1 \mu mol \cdot L^{-1}$ Dex;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'-ACCGCTTTGCCAACTACAT-3',下游引物:5'-GTCCCCGTCCACCTC-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 $100 \mu L$ 测蛋白浓度,取蛋白上清液,加入SDS-PAGE蛋白上清液, $100^\circ C$ 煮5 min后分装于EP管中, $-80^\circ C$ 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 $4^\circ C$ 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; $40 g \cdot L^{-1}$ 多聚甲醛溶液室温固定15~20 min, PBS洗片3次; $2 g \cdot L^{-1}$ Troton X-100 透化细胞7 min, $40 g \cdot L^{-1}$ 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 $\Delta\Delta Ct$ 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. Haemangioendothelioma 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.