

谷氧还蛋白 2 对高氧诱导的人晶状体上皮细胞过度迁移的抑制作用

宁小娜¹ 严宏^{1,2} 郭辰峻¹ 刘富伟³ 董茜¹

¹空军军医大学唐都医院眼科,西安 710038;²西安市第四医院 陕西省眼科医院 西安交通大学附属广仁医院眼科,西安 710004;³空军军医大学口腔医院颌面整形外科,西安 710032

通信作者:严宏,Email:yhongb@fmmu.edu.cn

【摘要】 目的 研究高氧环境对人晶状体上皮细胞(HLECs)迁移能力的影响及谷氧还蛋白 2(Grx2)对高氧诱导的 HLECs 迁移的抑制作用。方法 将 HLECs 分为高氧模型组和常氧对照组,高氧模型组采用含氧体积分数 80% 的混合气体培养 HLECs 2 d,构建体外高氧诱导的 HLECs 氧化损伤模型,常氧对照组常氧条件下培养 HLECs。利用细胞划痕试验观察各组细胞迁移情况;用鬼笔环肽染色法评估细胞骨架形态变化;采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 Grx2 mRNA 的表达变化。分别将高氧模型组和常氧对照组细胞再分为空质粒转染组和 Grx2 质粒转染组,通过转染不同质粒,观察不同转染组高氧模型细胞的迁移行为和骨架形态变化,并利用 MitoSOX 流式细胞仪检测不同转染组细胞线粒体活性氧簇(ROS)含量;采用 JC-1 染色法测定不同转染组细胞线粒体膜电位的变化并用激光扫描共焦显微镜进行观察。结果 常氧对照组和高氧模型组细胞培养过程中,生长状态良好。细胞划痕后 24 h 和 48 h,高氧模型组划痕距离小于常氧对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);高氧模型组细胞周长长于常氧对照组,差异有统计学意义($t = -2.254, P < 0.05$)。细胞培养后 2 d,高氧模型组细胞中 Grx2 mRNA 相对表达量为 0.54 ± 0.11 ,低于常氧对照组的 1.00 ± 0.00 ,差异有统计学意义($t = 7.128, P < 0.01$)。Grx2 质粒转染组细胞转染效率高 于 90%。高氧环境下,划痕后 24 h 和 48 h Grx2 质粒转染组细胞划痕距离宽于空质粒转染组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);Grx2 质粒转染组细胞中 Grx2 mRNA 相对表达量高于空质粒转染组,差异有统计学意义($P < 0.01$);Grx2 质粒转染组细胞线粒体 ROS 平均相对荧光强度弱于空质粒转染组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高氧条件下,Grx2 质粒转染组细胞红/绿荧光强度比高于空质粒转染组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 Grx2 可能通过对高氧下 HLECs 线粒体氧化应激的调控来抑制 HLECs 的过度迁移。

【关键词】 晶状体上皮细胞;高氧;谷氧还蛋白 2;细胞迁移;细胞培养

基金项目:国家自然科学基金项目(81570823)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.04.002

Inhibitory effects of glutathione 2 on excessive migration of human lens epithelial cells induced by hyperoxia

Ning Xiaona¹, Yan Hong^{1,2}, Guo Chenjun¹, Liu Fuwei³, Dong Qian¹

¹Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, China; ²Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Shaanxi Eye Hospital, Affiliated Guangren Hospital School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ³Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Yan Hong, Email: yhongb@fmmu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To observe the influences of hyperoxia on the migration of human lens epithelial cells (HLECs) and the inhibitory effects of glutathione 2 (Grx2) on excessive migration of HLECs induced by hyperoxia.

Methods The HLECs were divided into the hyperoxic model group and normoxic control group. HLECs were cultured in 80% oxygen mixture for 2 days to establish the oxidative damage model of HLECs induced by hyperoxia *in vitro* (hyperoxia model group), and cultured in normoxia mixture as the normoxic control group. Cell migration was observed by scratch test, cytoskeleton morphology was observed by phalloidin staining, and Grx2 mRNA level was detected by real-time quantitative PCR. HLECs in the hyperoxic model group and the normoxic control group were subdivided into empty plasmid transfection group and Grx2 plasmid transfection group, respectively. The migration behavior and cytoskeleton changes of hyperoxic model cells in different transfection groups were observed. MitoSOX staining was used to detect reactive oxygen species (ROS) content of mitochondria under flow cytometry, and JC-1

staining was used to observe the changes of mitochondrial membrane potential under laser-scanning confocal microscopy. **Results** In the process of cell culture, the cells grew well. Twenty-four hours and 48 hours after scratching, the scratch distance of the hyperoxic model group was smaller than that of the normoxic control group, with significant differences between them (both at $P < 0.05$). The cell circumference of the hyperoxic model group was increased compared with that of the normoxic group, with a significant difference between them ($t = -2.254, P < 0.05$). After 2 days culture, the relative expression level of Grx2 mRNA in the hyperoxic model group was 0.54 ± 0.11 , which was significantly lower than that in the normoxic control group ($t = 7.128, P < 0.01$). The transfection efficiency of Grx2 was higher than 90%. At 24 hours and 48 hours after scratching, the scratch distance in the Grx2 transfected hyperoxic model group was wider than that in the empty plasmid transfected hyperoxic model group, with significant differences between them (both at $P < 0.05$). The relative expression level of Grx2 mRNA in Grx2 transfected cells was up-regulated compared with that in empty plasmid transfected cells, with a significant difference between them ($P < 0.01$). Compared with the normoxic control group, the cell circumference of the hyperoxic model group was decreased, with a significant difference between them ($P < 0.05$). The relative mean fluorescence intensity of mitochondrial ROS in the Grx2 transfected hyperoxic model group was lower than that in the empty plasmid transfected hyperoxic model group, with a significant difference between them ($P < 0.05$). Under the hyperoxic condition, the red/green fluorescence intensity of Grx2 transfected group was higher than that of the empty plasmid transfected group, with a significant difference between them ($P < 0.01$). **Conclusions** Grx2 may inhibit the excessive migration of HLECs under hyperoxia by regulating oxidative stress in mitochondria.

[**Key words**] Lens epithelial cells; Hyperoxia; Glutathione 2; Cell migration; Cell culture

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570823)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.04.002

晶状体是眼内屈光系统的重要结构,氧供来源于视网膜血管弥散,生理状态下其处于低氧环境中^[1]。完整的玻璃体结构通过消耗氧使得眼内氧分布呈梯度降低并维持晶状体的低氧状态^[2]。由于玻璃体切割术后或老视眼玻璃体液化等原因导致玻璃体凝胶结构破坏,使晶状体暴露于高氧环境,进而导致晶状体发生混浊^[3-6]。人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, HLECs)是应对眼内高氧环境的第一道屏障,其功能状态直接影响晶状体的透明度,其中 HLECs 过度迁移被认为是白内障术后后囊膜混浊的主要原因之一^[7]。然而,手术并未解决晶状体暴露于高氧环境的问题,因此对 HLECs 在高氧环境下细胞功能状态,尤其是细胞迁移能力的研究非常重要。谷氧还蛋白 2 (glutathione 2, Grx2) 属于谷氧还蛋白系统,定位于细胞氧化活动中心,即线粒体内而发挥调节氧化还原平衡、修复氧化应激损伤的作用^[8-10],但其对 HLECs 迁移能力的影响鲜见报道。本研究中对高氧诱导的 HLECs 迁移能力进行评估,并探讨高氧环境下 Grx2 对细胞迁移能力的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

HLECs 系 HLE-B3 [编号: CRL-11421, 美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC)]; 低糖 DMEM 培养液 (1 000 mg/L 葡萄糖) (美国

HyClone 公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (杭州四季青公司); 转染试剂 Lipofectamine 2000 (美国 ThermoFisher 公司); 总 RNA 提取试剂 (RNAiso Plus)、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); 小鼠抗人 Grx2 抗体 (编号: ab167207; 英国 Abcam 公司); TRITC Phalloidin 罗丹明标记鬼笔环肽、DAPI 染液 (上海 YEASEN 公司); 线粒体超氧指示剂 MitoSOX 试剂盒 (美国 Life Technologies 公司); 线粒体探针 JC-1 检测试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)。S-4800 型激光扫描电子显微镜 (日本日立株式会社); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); FV1000 型激光扫描共焦显微镜、荧光倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); AccuriC6 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机 (湖南湘仪公司); 240L HERAccl240i 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司); BBS-DSC 超净台 (济南鑫贝西公司); 有机密闭培养箱 (美国 Billups-rothenberg 公司); 激光扫描共焦培养皿 (上海卧宏公司)。

1.2 方法

1.2.1 HLECs 高氧模型的建立 HLECs 细胞以 $3 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 密度接种于直径 6 cm 培养皿中, 分为高氧模型组和常氧对照组。高氧模型组细胞放入有机密闭培养箱中, 培养箱内充入高氧混合气体 (体积分数 80% O_2 、体积分数 5% CO_2 和体积分数 15% N_2), 培养箱置入 37 °C 恒温孵箱中 2 d, 建立高氧 HLECs 模型^[11]。常

氧对照细胞培养箱内充入常氧混合气体(21% O₂、5% CO₂和 74% N₂),其余操作同高氧模型组。

1.2.2 Grx2 过表达模型的构建 HLECs 接种于 6 孔板中进行培养,待细胞达到 70% 融合时将细胞分为 Grx2 质粒转染组和空质粒转染组。将 3 μg 含 Grx2 质粒或空质粒与 5 μl Lipofectamine 2000 混合,分别制备 Grx2 质粒转染液和空质粒转染液,静置 20 min 待用。将 6 孔板中细胞培养液更换为无血清培养液,按照分组不同加入已制备好的转染液,置入 5% CO₂、37 °C 孵箱中无血清培养 6 h,随后更换为 15% FBS 的低糖 DMEM 继续培养 48 h,收集细胞样品待测。

1.2.3 细胞划痕法评估细胞迁移距离 取各组培养细胞,分别以 1×10⁶/孔密度接种于 6 孔板,常规培养 24~36 h,待细胞贴壁形成细胞单层后,用 1 ml 枪头以无菌直尺沿孔中央直线划痕。吸弃培养液,PBS 漂洗 3 次以洗去细胞碎片。每孔加入 2 ml 无血清培养液,分别置于高氧/常氧环境 37 °C 孵箱内培养。分别于划痕后 0、24 和 48 h 后重复冲洗、换液,于光学显微镜下观察同一位置划痕宽度并拍照。采用 Image J 软件测量各时间点划痕宽度,独立重复 3 次试验,取平均值。

1.2.4 鬼笔环肽染色法观察细胞骨架 参照罗丹明标记鬼笔环肽试剂盒操作说明,将各组细胞以 1.5×10⁵个密度接种于激光扫描共焦培养皿(外径 35 mm,培养皿底直径 14 mm),待细胞达到 50% 融合后吸弃培养基,以质量分数 4% 多聚甲醛固定 10 min,用 37 °C 预热的 PBS 清洗 3 遍;加入质量分数 0.5% Triton X-100 溶液透化处理 5 min,PBS 清洗;滴加 200 μl TRITC 标记的鬼笔环肽工作液,室温孵育 30 min,PBS 清洗;以 200 μl DAPI 复染细胞核 30 s,PBS 清洗;用抗荧光淬灭封片剂封片,激光扫描共焦显微镜下观察细胞骨架分布情况并拍照,以细胞骨架周长代表其伸展范围。任意选取 5 个视野照片,随机各选 20 个细胞,采用 Image J 软件测量各组细胞的细胞周长,独立重复 3 次实验,取平均值。

1.2.5 免疫细胞化学法检测 HLE-B3 中 Grx2 蛋白表达 Grx2 质粒转染组和空质粒转染组细胞以 6×10⁴/孔的密度接种于 24 孔板,细胞贴壁后 24 h,PBS 清洗 2 遍,以 4% 多聚甲醛固定 20 min,滴加小鼠抗人 Grx2 抗体(1:500)4 °C 孵育过夜,PBS 清洗;滴加荧光二抗(1:500),室温下避光孵育 2 h,PBS 清洗;添加 Hoechst 荧光剂(1:4 000)染核,室温下避光孵育 10 min,PBS 清洗;用抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察细胞中 Grx2 表达情况。

1.2.6 荧光实时定量 PCR 法检测细胞中 Grx2 mRNA

表达 取各组细胞,用 RNAiso Plus 提取总 RNA,用逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA。PCR 引物序列:Grx2 上游引物为 5'-GCCTGTGAACCAGATCCAAGA-3',下游引物为 5'-CAGGTCCAGTTCACCACTT-3';β-actin 上游引物为 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3',下游引物为 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'。PCR 反应体系:SYBR II 10.0 μl,上、下游引物(北京奥科鼎盛公司,10 μmol/L)各 0.8 μl,cDNA 模板 2.0 μl,RNase-free ddH₂O 6.4 μl。扩增条件为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s,61 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 15 s,共 40 个循环。以 β-actin 为内参照,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算细胞中 Grx2 mRNA 相对表达量,实验重复 3 次,取平均值。

1.2.7 流式细胞法检测线粒体活性氧簇(MitoSOX 法)含量 取 Grx2 质粒转染组和空质粒转染组细胞,分别于高氧或常氧环境下培养 2 d。胰蛋白酶消化收集细胞,弃上清,加入 150 μl DMEM 培养基和 0.15 μl MitoSOX 荧光染料储存液,吹打混匀后于 37 °C 孵育 10 min。离心半径 10 cm,1 000 r/min 离心 5 min;弃上清,PBS 洗涤 1 次,加入 300 μl PBS 重悬(>10 000 个细胞),用流式细胞仪 FITC 通道检测线粒体活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)含量。

1.2.8 线粒体膜电位检测 参照 Invitrogen 试剂盒方法。分别取 1.5×10⁵个 Grx2 质粒转染组和空质粒转染组细胞接种于培养皿,细胞贴壁后给予常氧或高氧处理 2 d。吸弃培养基,PBS 洗涤 1 次,加入 10 μg/ml JC-1 染色工作液 1 ml 混匀,于 37 °C、5% CO₂条件下孵育 10 min。洗涤后加入 2 ml 细胞培养液,激光扫描共焦显微镜下观察,采用 Image J 软件分别测量各组细胞的红、绿色荧光强度,计算红/绿荧光强度比值,实验重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。本研究中计量资料经 Kolmogorov-Smirnov 检验符合正态分布,以 mean±SD 表示。各组细胞划痕距离采用重复测量两因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验;各组细胞周长、Grx2 mRNA 相对表达量、线粒体平均荧光强度和线粒体红/绿荧光强度比的差异比较均采用独立样本 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HLECs 的形态变化及迁移趋势

常氧对照组 HLECs 贴壁生长,边界清晰,生长状态良好;高氧模型组 HLECs 细胞生存状态欠佳,形态上稍有增宽(图 1)。高氧模型组和常氧对照组在不同

时间点划痕距离的总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 27.821, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 570.878, P < 0.05$), 其中划痕后 24 h 高氧模型组划痕距离为 $(163 \pm 27) \mu\text{m}$, 小于常氧对照组的 $(263 \pm 24) \mu\text{m}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 划痕后 48 h 高氧模型组划痕距离为 $(68 \pm 15) \mu\text{m}$, 小于常氧对照组的 $(120 \pm 24) \mu\text{m}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。

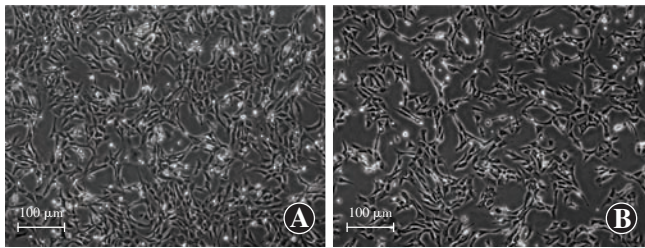


图 1 不同培养环境下 HLECs 形态 (标尺 = 100 μm) A: 常氧对照组 HLECs 贴壁生长, 边界清晰 B: 高氧模型组细胞形态增宽

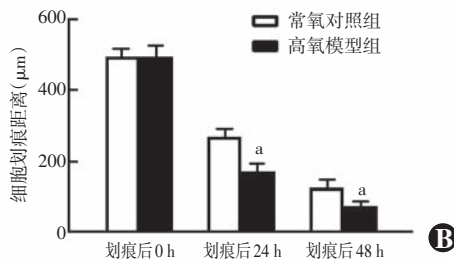
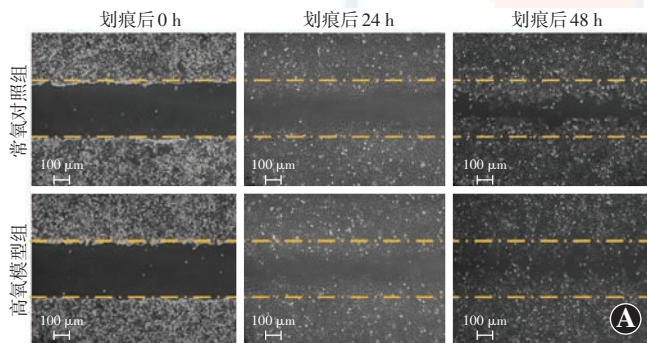


图 2 常氧对照组和高氧模型组细胞划痕间距比较 A: 划痕后 0、24 和 48 h 光学显微镜下照片 黄色虚线代表划痕起始间距 (标尺 = 100 μm) B: 不同时间点常氧对照组与高氧模型组划痕间距量化比较 $F_{\text{分组}} = 27.821, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 570.878, P < 0.05; F_{\text{交互作用}} = 16.761, P < 0.05$. 与常氧对照组比较, ^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, Bonferroni 检验, $n = 3$)

2.2 常氧对照组和高氧模型组细胞骨架变化

鬼笔环肽染色结果显示, 常氧对照组细胞骨架微丝纤维排列有序, 细胞间连接状态良好。高氧对照组细胞部分骨架呈现短宽表现, 部分细胞间连接断裂, 细胞排列疏松。高氧模型组细胞周长为 $(134.20 \pm 18.82) \mu\text{m}$, 长于常氧对照组的 $(117.31 \pm 14.39) \mu\text{m}$, 差异有统计

学意义 ($t = -2.254, P < 0.05$)。高氧环境下 HLECs 细胞骨架伸展范围扩大 (图 3)。

2.3 各组细胞中 Grx2 相对表达量变化

高氧模型组细胞中 Grx2 mRNA 相对表达量为 0.54 ± 0.11 , 较常氧对照组的 1.00 ± 0.00 明显降低, 差异有统计学意义 ($t = 7.128, P < 0.01$) (图 4)。

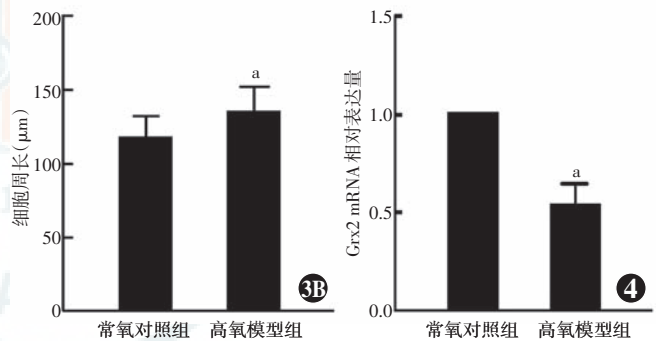
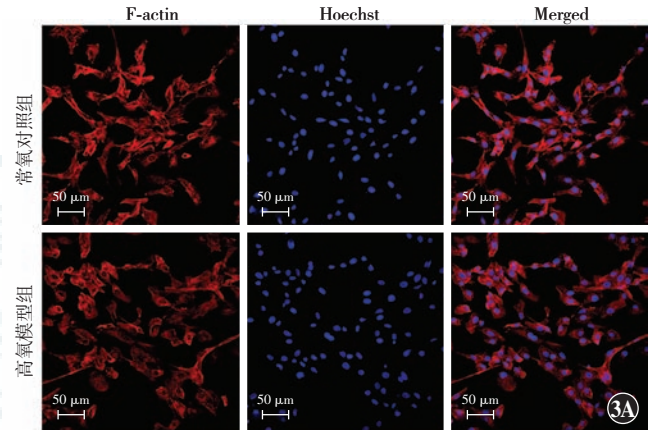


图 3 常氧对照组和高氧模型组细胞骨架变化 A: 常氧对照组和高氧模型组细胞骨架鬼笔环肽染色图 (标尺 = 50 μm) 细胞骨架 (F-actin) 呈红色荧光 (FITC), 细胞核呈蓝色荧光 (Hoechst) B: 2 个组细胞周长量化比较 与 HLECs 常氧组比较, ^a $P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 100$) 图 4 常氧对照组与高氧模型组细胞中 Grx2 mRNA 相对表达量比较 与常氧对照组比较, ^a $P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 注: Grx 谷氧还蛋白

2.4 Grx2 过表达细胞模型鉴定

常氧环境中 Grx2 质粒转染组细胞贴壁生长, 状态良好, 与空质粒转染组形态无明显差异 (图 5A, B)。Grx2 质粒转染组细胞中 Grx2 呈绿色荧光, 细胞核呈蓝色荧光, 转染效率高于 90% (图 5C); Grx2 质粒转染组细胞中 Grx2 mRNA 相对表达量为 136.53 ± 8.09 , 明显高于空质粒转染组细胞的 1.01 ± 0.07 , 差异有统计学意义 ($t = -29.297, P < 0.01$) (图 5D)。

2.5 高氧环境下 Grx2 质粒转染组和空质粒转染组细胞迁移距离变化

高氧环境下, 不同时间点 Grx2 质粒转染组和空质粒对照组细胞划痕距离总体比较, 差异均有统计学意义

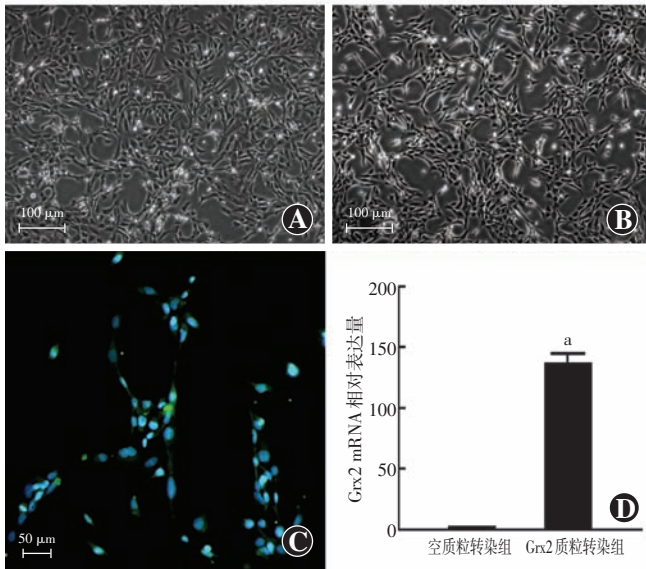


图 5 Grx2 过表达细胞模型鉴定 A:空质粒转染组 HLECs 细胞贴壁生长,生长状态良好(标尺=100 μm) B:Grx2 质粒转染组与空质粒转染组 HLECs 细胞形态无明显差异 C:Grx2 质粒转染组细胞免疫荧光表现(标尺=50 μm) 细胞中 Grx2 mRNA 表达阳性,呈绿色荧光(FITC),细胞核呈蓝色荧光(Hoechst) D:空质粒转染组与 Grx2 质粒转染组 Grx2 mRNA 相对表达量比较 与空质粒转染组比较,^a*P*<0.01(独立样本 *t* 检验,*n*=3) 注:Grx 谷氧还蛋白

(*F*_{分组} = 56.541, *P* < 0.05; *F*_{时间} = 230.221, *P* < 0.05), 其中划痕后 24 h, Grx2 质粒转染组划痕距离为 (213 ± 25) μm, 大于空质粒转染组的 (129 ± 37) μm, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 划痕后 48 h, Grx2 质粒转染组划痕距离为 (142 ± 24) μm, 大于空质粒转染组的 (28 ± 11) μm, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01) (图 6)。

2.6 高氧环境下空质粒转染组和 Grx2 质粒转染细胞骨架变化

高氧环境下,空质粒转染组细胞骨架部分呈短宽状,细胞间连接欠佳,骨架伸展范围扩大,Grx2 质粒转染组与空质粒转染组相比细胞间连接较紧密、骨架伸展范围较小。高氧环境下 Grx2 质粒转染组细胞周长为 (106.66 ± 8.38) μm, 短于空质粒转染组的 (122.78 ± 17.25) μm, 差异有统计学意义 (*t* = 2.498, *P* < 0.05) (图 7)。

2.7 不同质粒转染组 HLECs 中线粒体 ROS 生成量比较

常氧状态下,Grx2 质粒转染组细胞线粒体内相对平均荧光强度值为 1.00 ± 0.08, 与空质粒转染组的 0.84 ± 0.11 比较,差异无统计学意义 (*t* = 2.149, *P* > 0.05)。高氧状态下,Grx2 质粒转染组平均相对荧光强度值为 2.26 ± 0.33, 低于空质粒转染组的 3.16 ± 0.38, 差异有统计学意义 (*t* = 3.110, *P* < 0.05) (图 8)。

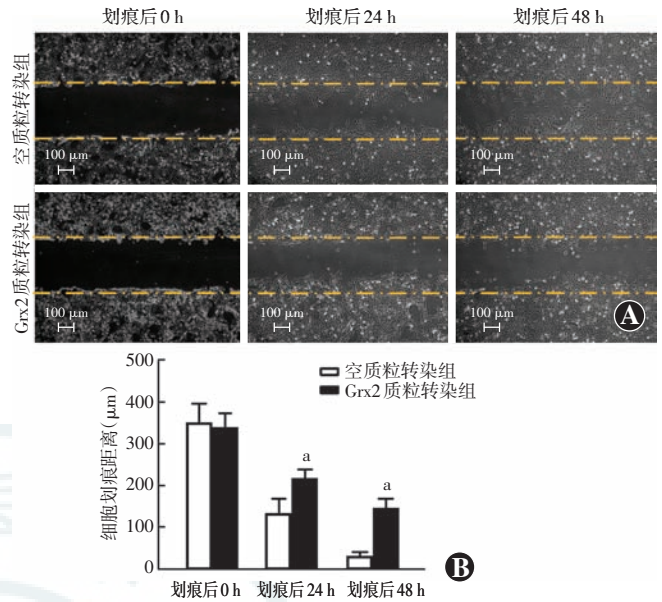


图 6 空质粒转染组与 Grx2 质粒转染组高氧模型细胞划痕距离比较 A:Grx2 质粒转染组和空质粒对照高氧环境下在 0、24 和 48 h 的划痕距离(标尺=100 μm) 黄色虚线代表划痕起始位置 B:不同时间点 Grx2 质粒转染组和空质粒对照高氧环境下划痕距离量化比较 *F*_{分组} = 56.541, *P* < 0.05; *F*_{时间} = 230.221, *P* < 0.05; *F*_{交互作用} = 7.571, *P* < 0.05. 与空质粒转染组高氧模型细胞的划痕间距比较,^a*P* < 0.05(重复测量两因素方差分析,Bonferroni 检验,*n*=3) 注:Grx 谷氧还蛋白

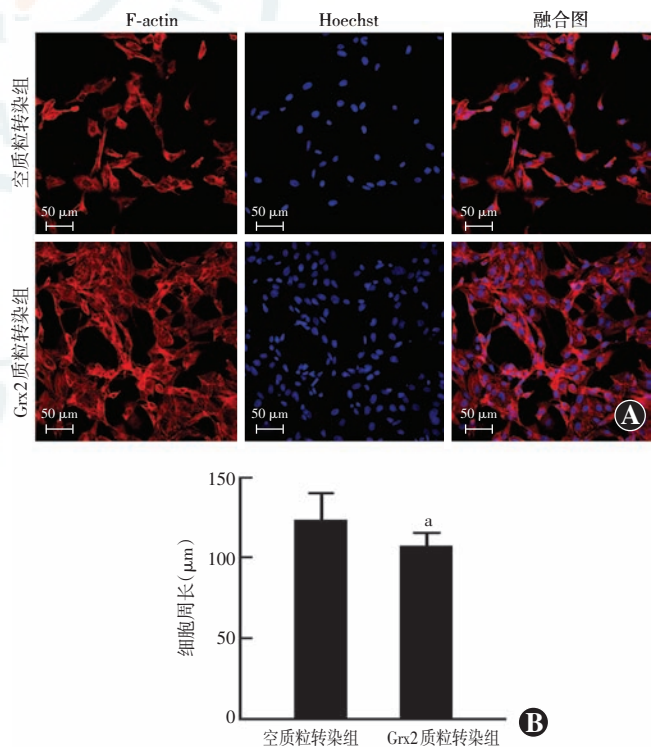


图 7 高氧环境下 Grx2 质粒转染组与空质粒转染组细胞骨架形态变化 A:Grx2 质粒转染组及空质粒转染组在高氧环境下的细胞骨架鬼笔环肽染色表现(标尺=50 μm) F-actin 呈红色荧光(FITC),细胞核呈蓝色荧光(Hoechst) B:2 个组细胞周长量化比较 与高氧空质粒转染组比较,^a*P* < 0.05(独立样本 *t* 检验,*n* = 100) 注:Grx 谷氧还蛋白

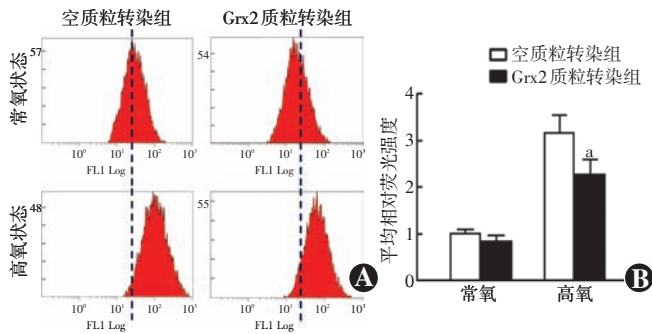


图 8 不同质粒转染组线粒体中活性氧生成量比较 A: 各组细胞流式细胞分析图 B: 各组细胞平均相对荧光强度量化比较 与各自空质粒转染组比较, ^a $P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 注: Grx 谷氧还蛋白

JC-1 染色显示, HLECs 在高氧环境下线粒体膜电位由正常的红色荧光占主导转为绿色荧光为主, 膜电位显著减低, 甚至丧失。常氧环境下, 空质粒转染组和 Grx2 质粒转染组细胞线粒体红/绿荧光强度比分别为 2.46 ± 0.23 和 2.57 ± 0.30 , 差异无统计学意义 ($t = 0.518$, $P > 0.05$); 高氧环境下, Grx2 质粒转染组红/绿荧光强度比为 1.08 ± 0.23 , 明显高于空质粒转染组的 0.30 ± 0.13 , 差异有统计学意义 ($t = 5.114$, $P < 0.01$) (图 9)。

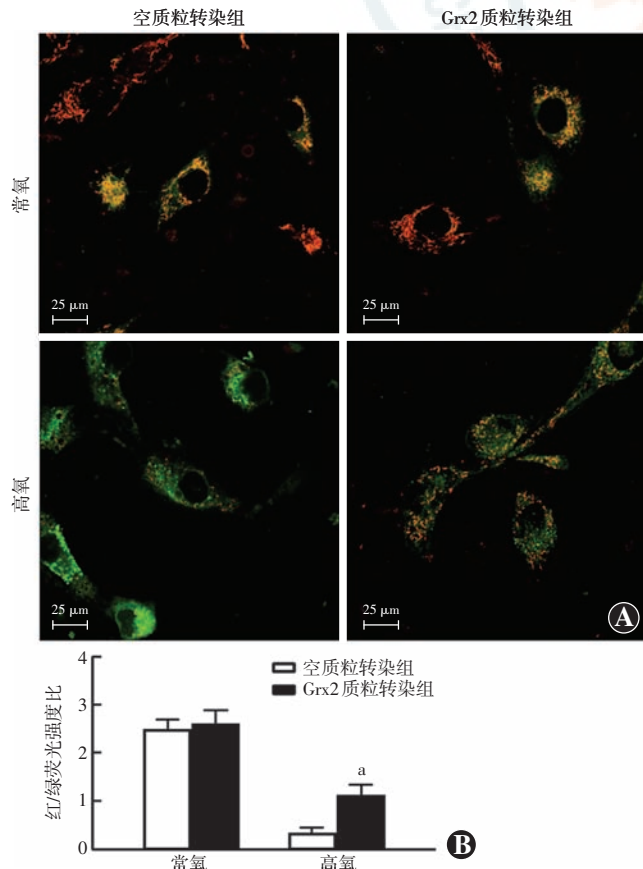


图 9 不同转染组细胞在不同环境下线粒体膜电位变化 A: 各组细胞荧光图 (标尺 = 25 μm) 红色代表正常膜电位, 膜电位处于较高状态; 绿色代表膜电位降低 B: 各组细胞相对荧光强度量化比较 与各自空质粒转染组比较, ^a $P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 注: Grx 谷氧还蛋白

3 讨论

HLECs 生物学行为变化的平衡和稳态对于晶状体透明性的维持至关重要, 各种因素引起的 HLECs 生物学行为的改变是多种白内障发生的细胞学基础, 其中细胞内应激反应失衡, 尤其是眼内高氧环境引起的氧化应激损伤, 因发生率高、致病性确切、符合老年人眼组织结构退化特点等原因日益受到关注。生理状态下, 晶状体处于生理性低氧环境, 玻璃体凝胶的完整性在视网膜高氧到晶状体低氧的氧浓度梯度的维持过程中发挥重要作用^[12]。高龄、手术、外界高氧等因素破坏了玻璃体的结构进而影响该平衡时导致晶状体周围氧浓度增加, 引起组织的氧化损伤, 进而可导致 HLECs 生物学行为改变, 发生白内障^[5, 13]。

生理状态下, 晶状体赤道区的 HLECs 随晶状体发育不断向内迁移至过渡区, 最终分化为纤维细胞, 维持晶状体透明度^[14-15]。病理状态下, HLECs 迁移能力改变将直接引起局部晶状体纤维结构的异常, 其中迁移能力过度增强已成为白内障囊外摘出术后后囊膜混浊的主要原因之一^[16-17]。本研究结果显示, 高氧环境下 HLECs 迁移能力过度增强, 同时高氧环境下作为 HLECs 迁移运动物质基础的细胞骨架伸展范围扩大。白内障摘出术联合人工晶状体植入术后眼内高氧环境并未改善, 提示眼内高氧环境可能促进 HLECs 过度迁移, 从而在后囊膜混浊的发生过程中起关键调控作用。此外, 高氧环境对全身多种细胞的迁移发挥影响的程度和趋势不同, 可能与细胞种类、介导途径和模型参数设置等因素的不同有关^[18]。

Grx2 是 TTase 抗氧化修复系统中的亚型之一, 存在于线粒体和细胞核中^[19]。Grx2 对 HLECs 线粒体性凋亡起一定的调控作用, 并与年龄相关性白内障的形成有关^[10]。本研究结果显示, HLECs 内 Grx2 含量与高氧环境间存在一定关联, 因此本研究在 HLECs 高氧模型的基础上利用质粒转染技术制备 Grx2 过表达模型, 结果显示 Grx2 过表达可有效抑制高氧环境下 HLECs 的过度迁移及细胞骨架伸展, 提示 Grx2 对高氧诱导性白内障有防治作用。

线粒体是细胞内氧代谢的主要功能场所, 高氧环境可能引起氧化呼吸链的异常^[20], 其功能状态在高氧诱导的白内障中可能起着重要作用。Grx2 定位于线粒体内的氧化应激调控酶, 其氧化还原作用严格调控着细胞内 ROS 水平, 对细胞氧化应激损伤具有直接的抑制作用, 越来越受到关注^[21-22]。研究表明, HLE-B3 细胞中 Grx2 可通过保护线粒体呼吸链复合体 I, 避免

硫醇化及失活能力的下降,从而发挥抗凋亡作用^[10]。本研究中检测了 Grx2 对高氧环境下线粒体功能的影响,证实 Grx2 过表达可显著改善高氧环境引起的线粒体 ROS 生成增多及膜电位近乎丧失的病理状态,起到保护性作用。

综上所述,本研究中通过建立 Grx2 过表达细胞模型对高氧诱导的 HLECs 迁移能力及 Grx2 在其中的作用进行研究,发现高氧引起的氧化损伤可导致 HLECs 过度迁移,上调 Grx2 可抑制这种病理改变,认为 Grx2 可能通过对高氧环境下 HLECs 线粒体氧化应激的调控对细胞发挥保护作用,本研究结果为进一步研究高氧慢性氧化刺激诱导的白内障发生和发展提供了理论和实验基础,也为白内障的基因治疗提供了新的靶点。然而,该过程中的具体分子机制尚不清楚,仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Shui YB, Fu JJ, Garcia C, et al. Oxygen distribution in the rabbit eye and oxygen consumption by the lens [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(4): 1571-1580. DOI: 10.1167/iov.05-1475.
- [2] Shui YB, Holekamp NM, Kramer BC, et al. The gel state of the vitreous and ascorbate-dependent oxygen consumption; relationship to the etiology of nuclear cataracts [J]. Arch Ophthalmol, 2009, 127(4): 475-482. DOI: 10.1001/archophthalmol.2008.621.
- [3] Fu Y, Dong Y, Gao Q. Age-related cataract and macular degeneration: oxygen receptor dysfunction diseases [J]. Med Hypotheses, 2015, 85(3): 272-275. DOI: 10.1016/j.mehy.2015.05.020.
- [4] Hayreh SS, Jonas JB. Posterior vitreous detachment; clinical correlations [J]. Ophthalmologica, 2004, 218(5): 333-343. DOI: 10.1159/000079476.
- [5] Beebe DC, Holekamp NM, Siegfried C, et al. Vitreoretinal influences on lens function and cataract [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011, 366(1568): 1293-1300. DOI: 10.1098/rstb.2010.0228.
- [6] Holekamp NM. The vitreous gel: more than meets the eye [J]. Am J Ophthalmol, 2010, 149(1): 32-36. DOI: 10.1016/j.ajo.2009.07.036.
- [7] Nibourg LM, Gelens E, Kuijter R, et al. Prevention of posterior capsular opacification [J]. Exp Eye Res, 2015, 136: 100-115. DOI: 10.1016/j.exer.2015.03.011.
- [8] 郭辰峻, 郭勇, 王嵩, 等. 紫外线照射诱导的人晶状体上皮细胞中谷胱甘肽白 2 上调对细胞凋亡的抑制作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(3): 169-175. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.03.003.
- [9] Wu H, Yu Y, David L, et al. Glutaredoxin 2 (Grx2) gene deletion induces early onset of age-dependent cataracts in mice [J]. J Biol Chem, 2014, 289(52): 36125-36139. DOI: 10.1074/jbc.M114.620047.
- [10] Wu H, Xing K, Lou MF. Glutaredoxin 2 prevents H₂O₂-induced cell apoptosis by protecting complex I activity in the mitochondria [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1797(10): 1705-1715. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.06.003.
- [11] Huang L, Yappert MC, Jumblatt MM, et al. Hyperoxia and thyroxine treatment and the relationships between reactive oxygen species generation, mitochondrial membrane potential, and cardiolipin in human lens epithelial cell cultures [J]. Curr Eye Res, 2008, 33(7): 575-586. DOI: 10.1080/02713680802167554.
- [12] Harocopos GJ, Shui YB, McKinnon M, et al. Importance of vitreous liquefaction in age-related cataract [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(1): 77-85.
- [13] Shui YB, Holekamp NM, Kramer BC, et al. The gel state of the vitreous and ascorbate-dependent oxygen consumption: relationship to the etiology of nuclear cataracts [J]. Arch Ophthalmol, 2009, 127(4): 475-482. DOI: 10.1001/archophthalmol.2008.621.
- [14] Augusteyn RC. On the growth and internal structure of the human lens [J]. Exp Eye Res, 2010, 90(6): 643-654. DOI: 10.1016/j.exer.2010.01.013.
- [15] Bassnett S, Šikić H. The lens growth process [J]. Prog Retin Eye Res, 2017, 60: 181-200. DOI: 10.1016/j.pre-leyeres.2017.04.001.
- [16] Zhang Y, Huang W. Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)-stimulated integrin-linked kinase (ILK) regulates migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lens epithelial cells via nuclear factor κ B (NF- κ B) [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 7424-7430. DOI: 10.12659/MSM.910601.
- [17] Shen Y, Dong LF, Zhou RM, et al. Role of long non-coding RNA MIAT in proliferation, apoptosis and migration of lens epithelial cells: a clinical and *in vitro* study [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(3): 537-548. DOI: 10.1111/jcmm.12755.
- [18] Kim SW, Kim IK, Ha JH, et al. Normobaric hyperoxia inhibits the progression of lung cancer by inducing apoptosis [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018, 243(9): 739-748. DOI: 10.1177/1535370218774737.
- [19] Xing K, Lou MF. The possible physiological function of thioltransferase in cells [J]. FASEB J, 2003, 17(14): 2088-2090. DOI: 10.1096/fj.02-1164fje.
- [20] Kong DQ, Liu Y, Li L, et al. Downregulation of Smac attenuates H₂O₂-induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress in human lens epithelial cells [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(27): 7419-7422. DOI: 10.1097/MD.00000000000007419.
- [21] Idelchik MDPS, Begley U, Begley TJ, et al. Mitochondrial ROS control of cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2017, 47: 57-66. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.04.005.
- [22] Chalker J, Gardiner D, Kuskal N, et al. Characterization of the impact of glutaredoxin-2 (GRX2) deficiency on superoxide/hydrogen peroxide release from cardiac and liver mitochondria [J]. Redox Biol, 2018, 15: 216-227. DOI: 10.1016/j.redox.2017.12.006.

(收稿日期: 2018-12-21 修回日期: 2019-03-04)

(本文编辑: 杜娟)

读者·作者·编者

本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片,为了反映组织标本大小的最精确尺度,请在电子版图片的左下方附注标尺。

(本刊编辑部)