

Smac 对人晶状体上皮细胞增生的抑制作用及促凋亡作用

孔德倩 郑广瑛 李莉 刘玥 蔡芳菲

450052 郑州, 郑州大学第一附属医院眼科 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室

通信作者: 郑广瑛, Email: zzzgy@zzu.edu.cn

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2017.03.010

【摘要】 背景 晶状体后囊膜混浊(PCO)是囊外白内障摘出术后的主要并发症,其发病机制与晶状体上皮细胞(LECs)的增生、移行和上皮-间质转化(EMT)有关,探讨相关的预防和靶向治疗措施至关重要。目的 探讨 Smac 对人 LECs 增生和凋亡的作用及防治 PCO 的生物学作用。方法 对 HLE-B₃ 细胞株及 Smac 过表达人 LECs 株进行培养,将培养的 HLE-B₃ 细胞分为 PBS 组、空质粒转染组和 siRNA-Smac3 转染组,分别将 PBS、空质粒载体和带有增强型绿色荧光蛋白(GFP)的 siRNA-Smac3 质粒转染细胞 24 h,计算 siRNA-Smac3 质粒转染率。在细胞培养液中分别添加不同质量浓度(5、10、20 和 50 μg/ml) TGF-β₂ 或 200 μmol/L H₂O₂ 以建立 PCO 模型或氧化应激凋亡模型。将细胞分为 PBS 组、TGF-β₂ 组和 Smac 过表达+TGF-β₂ 组,采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测细胞增生活力;将细胞分为 PBS 组、H₂O₂ 组和 siRNA-Smac+H₂O₂ 组,采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率;分别采用实时定量 PCR 和 Western blot 法检测培养的细胞中 Smac、caspase-3 及增生细胞核抗原(PCNA) mRNA 及蛋白的相对表达量。结果 siRNA-Smac3 质粒转染细胞后 GFP 阳性细胞达 80% 以上,荧光定量 PCR 筛选出最佳干扰质粒为 siRNA-Smac3。siRNA-Smac3 转染组 GFP 阳性细胞率为 (72.32±2.31)%,明显高于空质粒载体组的 (4.91±0.24)%,差异有统计学意义 ($t=116.342, P<0.001$)。LECs 中 Smac mRNA 相对表达量为 35.21±4.11,高于空质粒载体组的 15.24±2.48,差异有统计学意义 ($t=215.47, P<0.05$)。20 μg/ml TGF-β₂ 作用后 PBS 组、TGF-β₂ 组和 Smac 过表达+TGF-β₂ 组的细胞增生率分别为 (98.4±1.7)%、(98.9±0.1)% 和 (64.2±3.1)%, Smac 过表达+TGF-β₂ 组明显低于 TGF-β₂ 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。PBS 组、H₂O₂ 组和 siRNA-Smac+H₂O₂ 组细胞凋亡率分别为 (2.9±1.2)%、(45.1±4.5)% 和 (27.5±1.8)%, siRNA-Smac+H₂O₂ 组细胞凋亡率明显低于 H₂O₂ 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。荧光定量 PCR 结果显示, PBS 组、H₂O₂ 组和 siRNA-Smac+H₂O₂ 组 caspase-3 mRNA 相对表达量分别为 0.321±0.103、0.715±0.112 和 0.479±0.209, siRNA-Smac+H₂O₂ 组细胞中 caspase-3 mRNA 相对表达量明显低于 H₂O₂ 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。PBS 组、TGF-β₂ 组和 Smac 过表达+TGF-β₂ 组细胞中 PCNA mRNA 相对表达量分别为 0.299±0.013、0.645±0.102 和 0.490±0.209,与 TGF-β₂ 组比较, Smac 过表达+TGF-β₂ 组细胞中 PCNA mRNA 相对表达量明显下降,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。Western blot 结果显示, caspase-3 蛋白在 siRNA-Smac+H₂O₂ 组和 H₂O₂ 组相对表达量为 0.712±0.012 和 0.973±0.051, siRNA-Smac+H₂O₂ 组细胞中 caspase-3 蛋白的相对表达量明显低于 H₂O₂ 组,差异有统计学意义 ($t=132.52, P<0.05$)。PCNA 在 Smac 过表达+TGF-β₂ 组和 TGF-β₂ 组,相对表达量为 0.782±0.212,相对表达量为 1.126±0.251, Smac+TGF-β₂ 组 PCNA 蛋白相对表达量显著低于 TGF-β₂ 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 Smac 基因抑制人 LECs 株 HLE-B₃ 细胞系的增生并促进细胞的凋亡,其可能用于防治 PCO。

【关键词】 Smac; 凋亡; 增生; 后发性白内障; 人; 晶状体上皮细胞; 小干扰 RNA

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81270986、81670836)

The proliferative inhibition and apoptosis promotion of Smac on human lens epithelial cells Kong Deqian, Zheng Guangying, Li Li, Liu Yue, Cai Fangfei

Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Key Discipline Open Laboratory of Clinical Medicine for Institutions of Higher Learning in Henan Province, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Zheng Guangying, Email: zzzgy@zzu.edu.cn

[Abstract] Background Posterior capsular opacification (PCO) is a primary complication after extracapsular cataract extraction. The mechanism of PCO is associated with proliferation, migration and epithelial-

mesenchymal transition (EMT) of human lens epithelial cells (LECs). To explore the target treatment of PCO is very important. **Objective** This study was to investigate the biological effects of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac) on the proliferation and apoptosis of LECs. **Methods** Human LECs line (HLE-B₃) and Smac-overexpressed LECs line were cultured, and the cells were transfected using small interfering RNA (siRNA)-Smac3 plasmid with green fluorescent protein (GFP) for 24 hours. Different concentration of transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2) (5, 10, 20 and 50 $\mu\text{g/ml}$) or 200 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ were added respectively into the culture medium to establish PCO model and oxidative stress model. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to compare the cell proliferative activity among PBS group, TGF- β_2 group and Smac-hyperexpression + TGF- β_2 group. Flow cytometry was used to evaluate the apoptotic rate of the PBS group, H₂O₂ group and siRNA-Smac+H₂O₂ group. The expressions of Smac, caspase-3 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mRNA and their proteins in the cells were detected by real-time quantitative PCR (RT-PCR) and Western blot. **Results** The GFP⁺ cells were $\geq 80\%$ 12 hours after siRNA-Smac3 transfection, with the optimal plasmid of siRNA-Smac3. GFP⁺ cell rate was $(72.32 \pm 2.31)\%$ in the siRNA-Smac3 transfection group, which was significantly higher than that in the blank plasmid group $([4.91 \pm 0.24]\%)$ ($t=116.342, P<0.001$). The relevant expression levels of Smac was 35.21 ± 4.11 in the Smac-hyperexpression group, and that in the blank plasmid group was 15.24 ± 2.48 , with a significant difference between them ($t=215.47, P<0.05$). The cell viability of 20 ng/ml TGF- β_2 affected PBS group, TGF- β_2 group and Smac-hyperexpression+TGF- β_2 group was $(98.4 \pm 1.7)\%$, $(98.9 \pm 0.1)\%$ and $(64.2 \pm 3.1)\%$, and the cell viability of Smac-hyperexpression+TGF- β_2 group was significantly lower in the Smac-hyperexpression+TGF- β_2 group than that in the TGF- β_2 group ($P<0.05$). The apoptotic rate in the PBS group, H₂O₂ group and siRNA-Smac+H₂O₂ group were $(2.9 \pm 1.2)\%$, $(45.1 \pm 4.5)\%$ and $(27.5 \pm 1.8)\%$, and the apoptotic rate was evidently lower in the siRNA-Smac+H₂O₂ group than that in the H₂O₂ group ($P<0.05$). RT-PCR results showed that the expression levels of caspase-3 mRNA in PBS group, H₂O₂ group and siRNA-Smac+H₂O₂ group were 0.321 ± 0.103 , 0.715 ± 0.112 and 0.479 ± 0.209 , respectively. Compared with the H₂O₂ group, the relative expression level of caspase-3 mRNA in siRNA-Smac+H₂O₂ group was significantly decreased, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The PCNA mRNA expression levels in PBS group, TGF- β_2 group and Smac-hyperexpression+TGF- β_2 group were 0.299 ± 0.013 , 0.645 ± 0.102 and 0.490 ± 0.209 , respectively. Western blot results showed that the relative expression of caspase-3 protein in siRNA-Smac+H₂O₂ group and H₂O₂ group was 0.712 ± 0.012 and 0.973 ± 0.051 , with significant difference between the two groups ($t=132.52, P<0.05$). The relative expression of PCNA protein in Smac-hyperexpression+TGF- β_2 group was 0.782 ± 0.212 , which was lower than 1.126 ± 0.251 in the TGF- β_2 group ($P<0.05$). **Conclusions** Smac may prevent and treat PCO by inhibiting the proliferation and promoting apoptosis of human LECs.

[Key words] Smac; Apoptosis; Proliferation; After-cataract; Human; Lens epithelial cells; Small interfering RNA

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81270986, 81670836)

晶状体后囊膜混浊 (posterior capsule opacification, PCO) 又称为后发性白内障, 是白内障囊外摘出术后的常见并发症^[1], 可再次导致视力下降。统计学数据表明, 成年人 PCO 的发生率约为 50%, 儿童则为 100%^[2], 目前其发病机制尚未完全阐明。关于白内障术后发生 PCO 目前存在很多假说, 其中大部分学者认为上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 与 PCO 形成密切相关^[3-4], 转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 可诱导晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 的 EMT 过程, 促使 LECs 过度增生并迁移至晶状体后囊膜, 形成成纤维细胞和梭形细胞, 导致 PCO^[5]。次级线粒体源性 caspase 活化因子 (second mitochondria-derived activator of caspases, Smac)/DIABOL 是线粒体中促细胞凋亡的蛋白质, 研究证实 Smac 在心血管、肿瘤、消化道和神经

退行性疾病等的发病和进展中发挥重要作用^[6-7]。我们前期的研究发现, Smac 与白内障患者 LECs 的凋亡相关, 推测 Smac 可能有促进 LECs 增生的生物学作用^[8-9], 但其具体作用和可能的机制仍在研究过程中。本研究中拟通过判断与细胞增生周期密切相关的细胞增生活性指标——增生细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 在 LECs 中的表达变化探讨 Smac 蛋白对 LECs 增生活力和凋亡的影响, 为 PCO 的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人晶状体上皮细胞株 HLE-B3 (上海细胞生物中心); Smac 过表达人 LECs 株、含增强型绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的小干扰 RNA (small

interfering RNA, siRNA)-Smac 质粒(上海吉玛公司); TGF-β₂(郑州莱宝公司);流式凋亡试剂盒(上海凯基公司); Lipofectamine 2000、Opti-MEM、Trizol(美国 Invitrogen 公司);1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(上海碧云天生物公司);逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒、实时荧光定量 PCR 引物(上海生工生物有限责任公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒(日本同仁公司);兔抗人 Smac 多克隆抗体(ab32023, 1:1 000)、小鼠抗人 caspase-3 单克隆抗体(3CSP03, 1:200)、兔抗人 PCNA 多克隆抗体(ab18197, 1:1 000)(美国 Abcam 公司);兔抗人 β-actin 多克隆抗体(1:500)(上海优宁维生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 的筛选 根据 Smac 的基因序列,由上海吉凯公司提供 4 条靶链,分别是 siRNA-Smac1、siRNA-Smac2、siRNA-Smac3 和 siRNA-Smac4(表 1),采用实时荧光定量 PCR 法筛选出 siRNA-Smac3 转染效率最高的靶链。

表 1 Smac siRNA 序列

目的基因	序列
siRNA _{Smac1}	5'-CCAGACATCAGATGACTTCAA-3'
siRNA _{Smac2}	5'-GTAACGCAATGTACAAGTTTC-3'
siRNA _{Smac3}	5'-GCTGTGCTTTTCGTAACACAT-3'
siRNA _{Smac4}	5'-CGTAAATGCCTGATGCATGCA-3'
siRNA _{Smac NC}	5'-TTACCAACGGTGTCAATGGGTA-3'

注:Smac:次级线粒体源性 caspase 活化因子;siRNA:小干扰 RNA;NC:空质粒正常对照

1.2.2 LECs 的培养 将 HLE-B₃ 及 Smac 过表达 LECs 株分别接种在培养瓶里,置于含体积分数 15% 的胎牛血清和 100 μg/ml 青霉素的 DEME 培养基中,在体积分数 5% CO₂ 和体积分数 95% 空气的恒温培养箱中培育,温度为 37 ℃。细胞培养 12 h 后贴壁生长,选取对数期生长的细胞进行实验。

1.2.3 HLE-B₃ 细胞株的转染 将培养的细胞分为空质粒转染组和 siRNA-Smac3 质粒转染组,分别将空质粒载体和含 siRNA-Smac 的质粒导入 HLE-B₃,步骤如下,转染前 1 d 将细胞以约 2×10⁵ 个/L 的数量接种于 6 孔板进行孵育,待细胞贴壁后在细胞中加入 1.5 ml 400 μmol/L 的 TGF-β₂ 处理 12 h,更换为 OPTI-MEM 培养基继续培养 24 h,每孔抽取 5 μl siRNA-Smac,与 200 μl OPTI-MEM 混匀,静止 5 min,同时抽取 4 μl Lipofectamine 2000,与 200 μl OPTI-MEM 混匀 5 min,静止 30 min,制成转染复合物,将其导入每个培养孔中。实验重复 3

遍。PBS 组仅含正常细胞。

1.2.4 CCK-8 法测定 HLE-B₃ 细胞的增生活力 将培养的细胞分为 PBS 组、TGF-β₂ 组和 Smac 过表达 + TGF-β₂ 组,其中 PBS 组仅含 LECs,作为空白对照,各组细胞处理如下,将细胞以 3×10⁴ 个/L 的密度接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后更换培养基,分别添加 5、10、20 和 50 μg/ml TGF-β₂ 继续孵育 12 h,每孔加入 10 μl CCK-8 孵育 2 h,采用酶标仪在波长 450 nm 处测定吸光度(A)值代表细胞活力,每组设 5 个复孔。细胞活力率 = [A_(加药) - A_(空白)] / [A_(不加药) - A_(空白)]。实验重复 3 次,取其平均值。

1.2.5 流式细胞仪检测 HLE-B₃ 的凋亡 将细胞分为 PBS 组、H₂O₂ 组和 siRNA-Smac + H₂O₂ 组,其中 PBS 组仅含 LECs,作为空白对照。参照文献[10-11]的方法,根据分组分别在正常细胞和转染细胞的培养液中添加 400 μl 的 200 μmol/L H₂O₂,然后向细胞培养液中加入不含 EDTA 的胰蛋白酶进行消化,制备 HLE-B₃ 悬液,调整细胞密度为 1×10⁵ 个/L,离心半径为 3 cm,1 500 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤细胞 2 遍,加入 5 μl AnnexinV-APC 及 5 μl PI 染液混匀,暗光条件下反应 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 Smac 及 caspase-3 mRNA 的表达 收集转染后 48 h 的各组细胞,Trizol 提取细胞中 RNA,按照 TAKARA 试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,并按照荧光定量试剂盒说明书中的步骤扩增,总体系为 20.0 μl;SYBR Premix EX Taq 10.0 μl,ROX 0.4 μl,引物各 0.4 μl(表 2),模板 4.0 μl。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 反应 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参,采用相对定量 2^{-ΔΔCt} 法检测各组细胞中 Smac 及 caspase-3 mRNA 的相对表达量。每组设置 5 个复孔,实验重复 5 次,取平均值。

表 2 引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)
Smac	F:5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3'	143
	R:5'-GCACTTCTTCGTCAGTTTCC-3'	
Caspase-3	F:5'-CCTGTGGCTGTGTATCCGTC-3'	348
	R:5'-CCGAGATGTCATTCACGTGC-3'	
PCNA	F:5'-CATATGTGTGTCCTAAGAG-3'	175
	R:5'-GTTAGCTATCCTACGTGCGC-3'	
GAPDH	F:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	95
	R:5'-TCCACCACCCTGTTGCTG-3'	

注:Smac:次级线粒体源性 caspase 活化因子;PCNA:增生细胞核抗原

1.2.7 Western blot 法检测人 LECs 中 PCNA 和 caspase-3 蛋白的表达 各组细胞转染后 24 h 弃去无血清 DEME 培养基, PBS 冲洗细胞 3 遍, 在培养液中添加 2 μl 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 及 98 μl 蛋白裂解液, 混匀后冰上反应 30 min, 收集细胞, 离心半径为 3 cm, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 采用二甲酸喹啉法对蛋白进行定量检测, 剩余蛋白存放于 -80 °C 冰箱保存, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 随后蛋白转印到 PVDF 膜, 滴加一抗 4 °C 孵育过夜, 滴加二抗孵育 1 h, 采用 ECL 化学发光试剂盒进行曝光, 用 Photoshop CS6 统计软件分析条带灰度值。以 β-actin 作为内参, 计算 PCNA 和 caspase-3 蛋白的相对表达量, 即 PCNA 和 caspase-3 灰度绝对值/β-actin 灰度绝对值 (灰度绝对值 = 灰度值 - 背景灰度值)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。检测指标的数据资料经 K-S 检验呈正态检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组多水平研究设计, 各组间细胞转染率、细胞凋亡率及各组细胞中 PCNA mRNA 和 caspase-3 mRNA 及其蛋白相对表达量的总体比较均采用单因素方差分析; 各组细胞在不同质量浓度 TGF-β₂ 作用后细胞活力率的总体差异比较采用区组设计两因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养 HLE-B3 的生长情况及形态

倒置相差显微镜下可见, 培养的 LECs 生长状态良好, 没有微生物污染贴壁生长, 细胞呈梭形或长条形 (图 1A)。

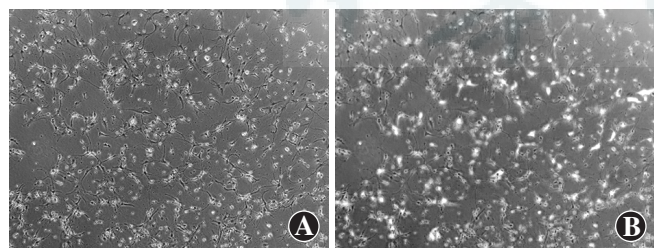


图 1 正常人晶状体细胞和转染细胞生长状态 (×200) A: 倒置相差显微镜下正常人晶状体细胞生长良好 B: 转染 24 h 后细胞转染状态 (GFP)

2.2 siRNA-Smac3 的转染效率

倒置荧光显微镜下观察 GFP 阳性细胞, 计算转染 24 h 后细胞的转染效率, 荧光定量筛选出最佳干扰质粒为 siRNA-Smac3。空质粒载体组和 siRNA-Smac3 转

染组 GFP 阳性细胞率分别为 (4.91 ± 0.24)% 和 (72.32 ± 2.31)%, siRNA-Smac3 转染组较空质粒载体组 siRNA-Smac3 转染率明显升高, 差异有统计学意义 (t = 116.342, P < 0.001)。荧光定量 PCR 检测显示, 对 Smac 过表达人 LECs 株 Smac 的 mRNA 相对表达量为 35.21 ± 4.11, 高于空质粒载体组的 15.24 ± 2.48, 差异有统计学意义 (t = 215.47, P < 0.05), Smac 过表达细胞中 Smac 蛋白相对表达量较空质粒载体组上升 (2.32 ± 0.12) 倍 (图 1B)。

2.3 各组 TGF-β₂ 不同质量浓度培养下细胞活力率的比较

PBS 组、TGF-β₂ 组和 Smac 过表达 + TGF-β₂ 组细胞在不同质量浓度 (0、15、20 和 50 ng/ml) TGF-β₂ 作用后细胞活力率的总体比较差异均有统计学意义 (F_{组别} = 214.25, P < 0.01; F_{质量浓度} = 188.75, P < 0.01)。PBS 组和 TGF-β₂ 组间细胞在不同质量浓度 TGF-β₂ 作用后细胞活力率的差异均无统计学意义 (均 P < 0.05), 随着 TGF-β₂ 质量浓度的增加, PBS 组和 TGF-β₂ 组各自组内的细胞活力率的变化差异均无统计学意义 (均 P > 0.05), 而 Smac 过表达 + TGF-β₂ 组随着 TGF-β₂ 质量浓度的增加, 细胞活力率逐渐下降, 20 ng/ml TGF-β₂ 和 50 ng/ml TGF-β₂ 作用后细胞活力率明显低于 0 ng/ml TGF-β₂ 作用后的测定值, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05), 20 ng/ml 和 50 ng/ml TGF-β₂ 作用后 Smac 过表达 + TGF-β₂ 组细胞活力率明显低于 PBS 组和 TGF-β₂ 组, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05) (表 3)。

表 3 各组 TGF-β₂ 不同浓度培养下细胞活力率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	不同质量浓度 TGF-β ₂ 下细胞活力率			
		0 ng/ml	15 ng/ml	20 ng/ml	50 ng/ml
PBS 组	5	98.6 ± 1.2	98.7 ± 0.4	98.4 ± 1.7	99.3 ± 0.3
TGF-β ₂ 组	5	97.6 ± 1.4	99.1 ± 0.3	98.9 ± 0.1	98.2 ± 1.0
Smac 过表达 + TGF-β ₂ 组	5	98.4 ± 0.2	88.5 ± 2.7	64.2 ± 3.1 ^{ab}	62.7 ± 2.1 ^{ab}

注: F_{组别} = 214.25, P < 0.01; F_{质量浓度} = 188.75, P < 0.01。与各自组内 0 ng/ml TGF-β₂ 值比较, ^aP < 0.05; 与各自同质量浓度 TGF-β₂ 作用后的 PBS 组值比较, ^bP < 0.05 (区组设计两因素方差分析, LSD-t 检验) TGF: 转化生长因子; Smac: 次级线粒体源性 caspase 活化因子

2.4 各组人 LECs 的凋亡率比较

流式细胞术检测显示, PBS 组细胞早期和晚期凋亡率均较少, H₂O₂ 组早期和晚期细胞凋亡率均明显增加, siRNA-Smac + H₂O₂ 组早期和晚期细胞凋亡率均明显高于 PBS 组而低于 H₂O₂ 组 (图 2A ~ C)。H₂O₂ 组、PBS 组和 siRNA-Smac + H₂O₂ 组间细胞凋亡率 (早期细胞凋亡率 + 晚期细胞凋亡率) 分别为 (2.9 ± 1.2)%、

(45.1±4.5)% 和 (27.5±1.8)%, 总体比较差异有统计学意义 ($F=188.75, P<0.05$), 与 PBS 组比较, H_2O_2 组和 siRNA-Smac+ H_2O_2 组细胞凋亡率均明显增加, 但 siRNA-Smac+ H_2O_2 组细胞凋亡率明显低于 H_2O_2 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 2D)。

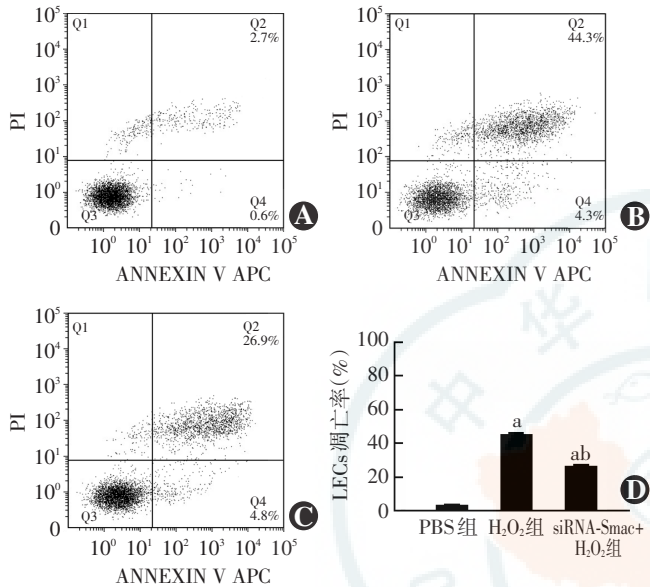


图 2 流式细胞术检测的各组细胞凋亡率 细胞早期凋亡率位于第 2 象限 (Q2), 晚期凋亡率位于第 4 象限 (Q4), 细胞凋亡率=Q2+Q4 A: PBS 组早期和晚期细胞凋亡率均较低 B: H_2O_2 组早期和晚期细胞凋亡率较 PBS 组均明显增加 C: siRNA-Smac+ H_2O_2 组早期和晚期细胞凋亡率较 PBS 组明显增加, 但明显低于 H_2O_2 组 D: 各组 LECs 凋亡率的量化比较 $n=3, F=188.75, P<0.05$. 与 PBS 组比较, $^a P<0.01$; 与 H_2O_2 组比较, $^b P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) LECs: 晶状体上皮细胞; Smac: 次级线粒体源性 caspase 活化因子

2.5 各组细胞中 caspase-3 mRNA 和 PCNA mRNA 的表达

PBS 组、 H_2O_2 组和 siRNA-Smac+ H_2O_2 组细胞中 caspase-3 mRNA 相对表达量分别为 0.321 ± 0.103 、 0.715 ± 0.112 和 0.479 ± 0.209 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=117.25, P<0.05$), 与 H_2O_2 组比较, siRNA-Smac+ H_2O_2 组细胞中 caspase-3 mRNA 相对表达量明显下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 3A)。PBS 组、TGF- β_2 组和 Smac 过表达+TGF- β_2 组细胞中 PCNA mRNA 相对表达量分别为 0.299 ± 0.013 、 0.645 ± 0.102 和 0.490 ± 0.209 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=156.37, P<0.05$), 与 TGF- β_2 组比较, Smac 过表达+TGF- β_2 组细胞中 PCNA mRNA 相对表达量明显下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 3B)。

2.6 各组细胞中 PCNA 及 caspase-3 蛋白的表达

TGF- β_2 组、Smac 过表达+TGF- β_2 组和 PBS 组 PCNA 蛋白相对表达量分别为 1.126 ± 0.251 、 $0.782 \pm$

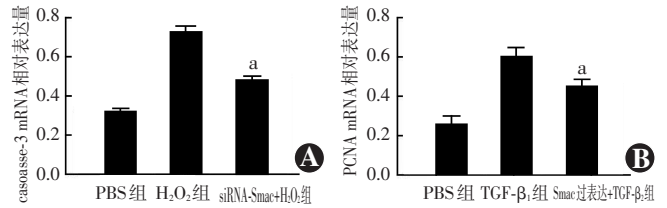


图 3 各组细胞中 caspase-3 mRNA 和 PCNA mRNA 的相对表达量比较 A: 各组细胞中 caspase-3 mRNA 的比较 与 H_2O_2 组比较, $^a P<0.05$ B: 各组细胞中 PCNA mRNA 的比较 与 TGF- β_2 组比较, $^a P<0.05$ Smac: 次级线粒体源性 caspase 活化因子; TGF: 转化生长因子

0.212 和 0.155 ± 0.138 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F=179.45, P<0.05$), Smac 过表达+TGF- β_2 组细胞中 PCNA 蛋白相对表达量明显低于 TGF- β_2 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。 H_2O_2 组、siRNA-Smac+ H_2O_2 组和 PBS 组 caspase-3 蛋白表达量分别为 0.973 ± 0.051 、 0.712 ± 0.012 和 0.225 ± 0.156 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F=167.82, P<0.05$), H_2O_2 组细胞中的 caspase-3 蛋白表达量明显高于 siRNA-Smac+ H_2O_2 组, 组间差异有统计学意义 ($t=132.52, P<0.05$) (图 4)。

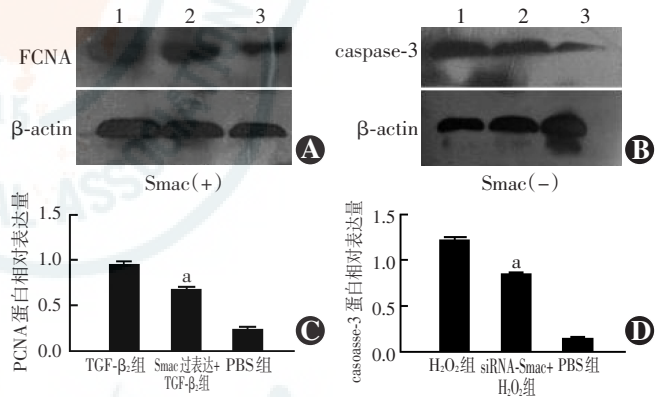


图 4 Western blot 法检测各组细胞中 PCNA 及 caspase-3 蛋白的表达 A: TGF- β_2 组、Smac 过表达+TGF- β_2 组和 PBS 组 PCNA 蛋白表达电泳图 1: TGF- β_2 组 2: Smac 过表达+TGF- β_2 组 3: PBS 组 B: H_2O_2 组、siRNA-Smac+ H_2O_2 组和 PBS 组 caspase-3 蛋白表达电泳图 1: H_2O_2 组 2: siRNA-Smac+ H_2O_2 组 3: PBS 组 C: TGF- β_2 组、Smac 过表达+TGF- β_2 组和 PBS 组 PCNA 蛋白量化比较 ($t=179.45, P<0.05$). 与 TGF- β_2 组比较, $^a P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=18$) D: H_2O_2 组、siRNA-Smac+ H_2O_2 组和 PBS 组 caspase-3 蛋白量化比较 ($F=167.82, P<0.05$) 与 H_2O_2 组比较, $^a P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=18$) PCNA: 增生细胞核抗原; TGF: 转化生长因子; Smac: 次级线粒体源性 caspase 活化因子

3 讨论

PCO 发病机制复杂, 年龄、性别、糖尿病、葡萄膜炎、视网膜色素变性、近视、IOL 材料、炎性介质、细胞因子和生长因子的激活和释放等都是诱发 PCO 的重要因素^[12-13]。白内障囊外摘出术后手术创伤引起

LECs 增生、迁移、EMT 等生物学行为改变,且引起胶原沉积和晶状体纤维再生,进而 LECs 可覆盖视轴区域,产生 PCO、光散射、单眼复视、对比敏感度下降和视力障碍,此外 LECs 也可间接地通过机械性牵拉引起并发症,如后囊皱褶或折叠 IOL 移位。

目前已知 Smac/DIABOL 蛋白参与神经细胞和肿瘤细胞等的凋亡途径^[14-15],研究表明,Smac 介导经典细胞凋亡的线粒体途径,其中 Smac 和细胞色素 C 在凋亡信号刺激下从线粒体中释放,Smac 结合凋亡抑制剂(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)阻止其释放。IAPs 主要有 3 种蛋白构成,分别为细胞凋亡抑制因子 1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1, cIAP1)、cIAP2 及 X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)。与 XIAP 结合后的 Smac 直接激活 caspase-9,诱导人 LECs 的凋亡^[16]。PCNA 在影响细胞增生的过程中起到重要作用,对细胞复制和增生发挥调控作用,是细胞 DNA 合成的重要标志。本研究结果发现,Smac 过表达的 LECs 中 PCNA 蛋白表达降低,表明 Smac 能够影响人 LECs 的增生,参与阻止上皮细胞的移行及分化,从而阻止 EMT 的发生;此外,当利用 siRNA 干扰 Smac 的表达后凋亡标志蛋白 caspase-3 随着 Smac 表达的降低而降低,同时流式细胞术检测显示人 LECs 凋亡率也相应降低,表明 Smac 能够促进人 LECs 的凋亡,分析 Smac 既具有抑制人 LECs 增生的作用,也可促进人 LECs 的凋亡,这种叠加作用是 Smac 蛋白抑制 PCO 发生的细胞学基础。我们认为 Smac 通过减少人 LECs 的数量来防止其增生与迁移,这种预防 PCO 的方式符合生理情况下 LECs 的死亡方式,并且不会引起炎症反应。

本研究中通过 TGF- β_2 诱导人 LECs 增生,利用 H₂O₂ 诱导人 LECs 的凋亡,结果表明 Smac/DIABOL 能够促进人 LECs 的凋亡,从而对 PCO 的形成发挥预防作用,其具体机制仍需进一步探讨。研究表明,PCO 发生后行 Nd:YAG 激光后囊切开术的治疗作用是有限的^[17],晶状体后囊膜的逐渐混浊过程对白内障囊外摘出术后视力的恢复和视觉质量产生很大影响,并且需要额外的治疗措施,也增加了黄斑囊样水肿和视网膜脱离等疾病的潜在风险,因此本研究为 PCO 的药物预防和治疗提供了依据。

参考文献

- Milazzo S, Grenot M, Benzerroug M. Posterior capsule opacification[J]. J Fr Ophthalmol, 2014, 37(10): 825-830. DOI:10.1016/j.jfo.2014.09.003.
- Fong CS, Rajak SN, Pirbhaj A, et al. Audible blink in prostaglandin-associated periorbitopathy[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2016, 44(7): 630-631. DOI:10.1111/ceo.12725.
- Lukaszewska-Smyk A, Kałuzny J. Pathogenesis of posterior capsule opacification in pseudophakia[J]. Klin Oczna, 2009, 111(10-12): 369-374.
- Wertheimer C, Brandlhuber U, Kook D, et al. Erufosine, a phosphoinositide-3-kinase inhibitor, to mitigate posterior capsule opacification in the human capsular bag model[J]. J Cataract Refract Surg, 2015, 41(7): 1484-1489.
- Saxby L, Rosen E, Boulton M. Lens epithelial cell proliferation, migration, and metaplasia following capsulorhexis[J]. Br J Ophthalmol, 1998, 82(8): 945-952.
- Alsharafi WA, Bi FF, Hu YQ, et al. Effect of Khat on apoptosis and related gene Smac/DIABLO expression in the cerebral cortex of rats following transient focal ischemia[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015, 39(1): 424-432. DOI:10.1016/j.etap.2014.12.011.
- Korga A, Korobowicz E, Dudka J. Role of mitochondrial protein Smac/Diablo in regulation of apoptotic pathways[J]. Pol Merkur Lekarski, 2006, 20(119): 573-576.
- 郑广瑛, 梁圆圆, 王倩. 年龄相关性白内障晶状体上皮细胞的 Smac、caspase-3 表达及死亡方式[J]. 眼科研究, 2010, 28(4): 351-355. DOI:10.3969/j.issn.1003-0808.2010.04.017.
- Zheng GY, Liang YY, Wang Q. The studies on the expressions of Smac, caspase-3 in LECs and death pattern of LECs in age-related cataract[J]. Chin Ophthal Res, 2010, 28(4): 351-355. DOI:10.3969/j.issn.1003-0808.2010.04.017.
- 李云, 郑广瑛, 蒋瑜. Smac siRNA 慢病毒载体的构建及其对 Smac 基因沉默效果的鉴定[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(3): 199-204. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.03.002.
- Li Y, Zheng GY, Jiang Y. Construction of Smac siRNA lentiviral vector and its silencing effect on Smac gene in human LECs[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(3): 199-204. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.03.002.
- 祝凤梅, 郑广瑛, 郑艳, 等. 红景天苷对人晶状体上皮细胞氧化损伤保护作用的研究[J]. 中华眼科杂志, 2015, 51(2): 130-135. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.02.014.
- Zhu FM, Zheng GY, Zheng Y, et al. Protective effect of Salidroside on oxidative damage to human lens epithelial cells[J]. Chin J Ophthalmol, 2015, 51(2): 130-135. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.02.014.
- 李云, 郑广瑛, 刘玥. Salubrinal 对人晶状体上皮细胞中内质网应激的影响[J]. 中华眼科杂志, 2016, 52(6): 437-443. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2016.06.008.
- Li Y, Zheng GY, Liu Y. Salubrinal protects human lens epithelial cells against endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis[J]. Chin J Ophthalmol, 2016, 52(6): 437-443. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2016.06.008.
- 解芳, 钟洪珊, 张林. 后天性白内障发生机制研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(4): 754-756.
- Xie F, Zhong HS, Zhang L. Advances of mechanism in posterior capsule opacification[J]. Prog Modern Biomed, 2008, 8(4): 754-756.
- Nibourg LM, Gelens E, Kuijjer R, et al. Prevention of posterior capsular opacification[J]. Exp Eye Res, 2015, 136: 100-115. DOI:10.1016/j.exer.2015.03.011.
- Shintani M, Sangawa A, Yamao N, et al. Smac/DIABLO expression in human gastrointestinal carcinoma: association with clinicopathological parameters and survivin expression[J]. Oncol Lett, 2014, 8(6): 2581-2586. DOI:10.3892/ol.2014.2598.
- Zhang F, Zhang L, Sun LL, et al. Effects of fluid shear stress on expression of Smac/DIABLO in human umbilical vein endothelial cells[J]. Curr Ther Res Clin Exp, 2013, 74: 36-40. DOI:10.1016/j.curtheres.2012.11.002.
- Yao H, Tang X, Shao X, et al. Parthenolide protects human lens epithelial cells from oxidative stress-induced apoptosis via inhibition of activation of caspase-3 and caspase-9[J]. Cell Res, 2007, 17(6): 565-571. DOI:10.1038/er.2007.6.
- Ruiz-Casas D, Barrancos C, Alio JL, et al. Effect of posterior neodymium: YAG capsulotomy. Safety evaluation of macular foveal thickness, intraocular pressure and endothelial cell loss in pseudophakic patients with posterior capsule opacification[J]. Arch Soc Esp Ophthalmol, 2013, 88(11): 415-422. DOI:10.1016/j.oftal.2013.04.003.

(收稿日期:2016-12-24)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)