

瞬时受体电位 M7 在地塞米松诱导的小梁细胞骨架蛋白重塑中的作用

刘丽玲 徐建刚 欧阳智琨 杨扬帆 吴开力 余敏斌

510060 广州,中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室

通信作者:余敏斌,Email:yuminbin@mail.sysu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.04.006

【摘要】 目的 探讨瞬时受体电位 M7 (TRPM7) 在地塞米松诱导的小梁细胞骨架蛋白重塑中的作用。方法 采用人小梁细胞株进行体外培养,第 3~6 代小梁细胞用于实验。采用免疫荧光检测技术对 TRPM7 在小梁细胞中的表达进行定位。在细胞培养基中加入 0.2 mg 地塞米松处理小梁细胞 4 d,终浓度分别为 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 和 1×10^{-7} mol/L,采用 Western blot 法检测细胞中 TRPM7 蛋白在细胞中的表达量。将培养的小梁细胞分为正常对照组、siRNA 转染组、TRPM7-siRNA1 转染组和 TRPM7-siRNA2 转染组,采用 Western blot 法检测细胞中 TRPM7 和 p-cofilin 相对蛋白表达量。将培养的细胞分为正常对照组、TRPM7-siRNA 转染组、地塞米松处理组和 TRPM7-siRNA 转染+地塞米松组,采用免疫荧光技术法观察各组细胞中细胞骨架蛋白 Phalloidin 和黏着斑蛋白 Vinculin 的表达。将培养的细胞分为正常对照组、地塞米松处理组、siRNA 转染组、TRPM7-siRNA 转染组、TRPM7 抑制剂 2-APB 处理组和钙离子螯合剂 EGTA 处理组,采用免疫荧光技术测定各组细胞内钙离子荧光强度变化。结果 TRPM7 主要分布于小梁细胞的细胞膜,TRPM7 蛋白相对表达量随着地塞米松剂量的增加而逐渐下降,组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 4.210, P < 0.05$), 1×10^{-5} mol/L 地塞米松组细胞中 TRPM7 蛋白表达量明显低于正常对照组,差异有统计学意义 ($P = 0.011$)。与正常对照组和 siRNA 转染组比较,TRPM7-siRNA1 组和 TRPM7-siRNA2 组细胞中 TRPM7 蛋白相对表达量均明显降低,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。倒置显微镜下可见地塞米松处理组和 TRPM7-siRNA 转染组细胞突起减少,细胞体稍变大。免疫荧光法显示地塞米松处理组小梁细胞骨架张力纤维和黏着斑蛋白增多,TRPM7-siRNA 转染组细胞中张力纤维变少、变细。与正常对照组和 siRNA 转染组比较,地塞米松处理组和 TRPM7-siRNA 转染组细胞内钙离子荧光强度变弱。Western blot 检测显示,TRPM7-siRNA 转染组细胞中 p-cofilin 蛋白相对表达量明显低于 siRNA 转染组 (0.317 ± 0.031 vs. 0.092 ± 0.071),差异有统计学意义 ($t = 5.030, P = 0.007$)。结论 高剂量地塞米松作用后可导致小梁细胞中 TRPM7 蛋白表达量下调,TRPM7 蛋白下调可能通过使小梁细胞骨架微丝蛋白解聚和细胞内钙离子浓度的降低而参与地塞米松诱导的小梁细胞中细胞骨架的重塑。

【关键词】 小梁细胞; 瞬时受体电位; 地塞米松; 人; 小干扰 RNA; 瞬时受体电位 M7

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212712)

Effects of transient receptor potential melastatin 7 on dexamethasone-mediated cytoskeletal protein remodeling of trabecular meshwork cells

Liu Liling, Xu Jianguang, Ouyang Zhikun, Yang Yangfan, Wu Kaili, Yu Minbin

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: Yu Minbin, Email: yuminbin@mail.sysu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of transient receptor potential melastatin (TRPM) 7 on dexamethasone (Dex)-mediated cytoskeleton remodeling in human trabecular meshwork. **Methods** Human trabecular meshwork cells (HTMs) were primarily cultured and the cells of generation 3 to 6 were used in this study. The expression of TRPM7 protein in the cells was located using immunofluorescence technology. Dex at the dose of 0.2 mg was added into culture medium for 4 days with the final concentration of 1×10^{-5} , 1×10^{-6} and 1×10^{-7} mol/L, respectively. Western blot assay was employed to detect the relative expression level of TRPM7 protein. Cultured cells were divided into non-transfected group, siRNA transfected group, TRPM7-siRNA1 transfected group and TRPM7-siRNA2 transfected group, and the expressions of TRPM7 protein and p-cofilin protein in the cells were assayed by Western blot method. Cultured cells were divided into normal control group, Dex-treated group, siRNA transfected group and TRPM7-siRNA transfected group, and the expression of phalloidin (a cytoskeletal protein) and Vinculin (focal adhesion protein) was detected by immunofluorescence staining. In addition, cultured cells were divided into normal control group, Dex-treated group, 2-APB (a Ca^{2+} inhibitor) treated group, ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) (a calcium chelator)-treated group, TRPM7-siRNA transfected group and TRPM7-siRNA+Dex group, and

the $[Ca^{2+}]_i$ in the cells was observed by Fluo-3AM immunofluorescence staining. Western blot assay was used to detect the expression of p-cofilin in the cells. **Results** TRPM7 was positively expressed on the cell membrane. The relative expression of TRPM7 was gradually reduced with an increase of Dex dose ($F=4.210, P<0.05$), and the expression of TRPM7 was significantly decreased in 1×10^{-5} mol/L Dex group compared with the normal control group ($P<0.05$). Western blot assay revealed that the relative expression levels of TRPM7 in the TRPM7-siRNA1 and TRPM7-siRNA2 group were significantly lower than those of non-siRNA transfected group and siRNA transfected group (all at $P<0.05$). In the Dex-treated group and TRPM7-siRNA transfected group, the cells were enlarged in size with the lessened processes in comparison with the normal control group. Immunofluorescence staining showed that the actin fiber and vinculin increased in the Dex-treated group, and more spread but depolymerized actin fiber was seen in the TRPM7-siRNA transfected group. Compared with the normal control group, the fluorescence intensity of $[Ca^{2+}]_i$ was weak in the Dex-treated group and TRPM7-siRNA transfected group. The relative expression levels of p-cofilin protein was lower in the TRPM7-siRNA transfected group than that in the siRNA transfected group (0.317 ± 0.031 vs. 0.092 ± 0.071) ($t=5.030, P=0.007$). **Conclusions** Dex induces the downregulation of TRPM7 expression in HTMs. The downregulation of TRPM7 probably participates in Dex-induced cytoskeletal remodeling by causing the depolymerization of actin cytoskeleton and reduction of $[Ca^{2+}]_i$ in HTMs.

[Key words] Trabecular meshwork cells; Transient receptor potential; Dexamethasone; Human; Small interfering RNA; Transient receptor potential melastatin 7

Fund program: Guangzhou Science and Technology Plan Project (2014A020212712)

青光眼是由多因素引起的不可逆性致盲眼病。原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma, POAG) 是一种常见的青光眼类型, 持续眼压升高是其致盲的主要危险因素^[1]。正常眼压的维持主要依靠小梁网和邻管组织对房水外流的调节作用, 研究发现青光眼患者小梁细胞的数量和形态与正常人明显不同^[2]。有文献报道, 改变小梁细胞的形态、体积、收缩能力以及细胞外基质成分、含量和黏附作用均对小梁网途径的房水流出产生影响^[3-5], 其中小梁细胞骨架的重塑是主要的影响因素^[6]。研究发现结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 及其下游产物神经介素 U (neuromedin U, NMU) 影响小梁细胞的骨架结构, 导致猪眼房水外流受阻^[7]。然而, 在疾病进程中小梁细胞骨架的变化涉及到的具体机制尚未完全阐明。目前由糖皮质激素导致的青光眼, 尤其地塞米松致青光眼的发病机制仍不十分清楚, 文献所述的地塞米松致青光眼的发病机制主要由于细胞外基质堆积并堵塞小梁细胞的房水滤过通道和引起的交联骨架, 使得细胞不能应对房水压力变化, 最终妨碍房水外流^[8-9]。瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道是一类感受器, 能对生物细胞感受广泛的物理和化学刺激发挥协调作用。哺乳类动物中根据 TRP 的同源性分为 28 个 TRP 通道, 其中 TRPM7 在细胞骨架重塑中发挥重要作用^[10-13]。目前关于 TRPM7 与组织的生理病理关系的研究主要聚焦于视网膜^[14-16], 而 TRPM7 与眼小梁细胞的关系鲜见报道。研究表明, 小梁细胞肌动蛋白纤维 (微丝) 的组装受外部钙、镁离子的影响, 同时, 微丝的聚合和解聚又受丝切蛋白磷酸化

的调控。由于在其他细胞中 TRPM7 通道能通过钙、镁离子和 C 末端的磷酸激酶区调节细胞骨架结构, 因此我们推测 TRPM7 在小梁细胞中有类似作用。本研究中拟构建地塞米松诱导的小梁细胞骨架重塑模型, 通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 转染技术调控细胞中 TRPM7 的表达, 探讨 TRPM7 在小梁细胞骨架重塑中的作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人小梁网原代细胞 (细胞株) 购于美国 Science Cell 公司, 所有实验所使用的细胞均为 3 ~ 6 代传代细胞。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 低糖培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 胰蛋白酶 (广州吉诺生物公司); 辣根过氧化物酶标记马抗鼠 IgG 抗体 (7076)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体 (7074)、Alexa-Fluor 488 标记山羊抗鼠抗体 (4408)、Alexa-Fluor 555 标记山羊抗兔抗体 (4413)、兔抗 P-cofilin 单克隆抗体 (3313)、兔抗 cofilin 多克隆抗体 (3318) (美国 CST 公司); 兔抗 TRPM7 单克隆抗体 (ab109438)、兔抗 Vinculin 单克隆抗体 (ab129002) (美国 Abcam 公司); 鼠抗 TRPM7 单克隆抗体 (NBP2-12906) (美国 Novus Biologicals 公司); Hoechst 33258 (广州碧云天公司); Fluo-3AM、地塞米松 (美国 Sigma 公司); 快速封闭液 (上海启动元生物科技有限公司)。CO₂ 培养箱 (美国 Shellab 公司); 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); LSM 510 Meta 激光扫描共焦显微镜 (德国 Zeiss 公

司);离心机(德国 Eppendorf 公司);电泳仪(美国 BIO-RAD);Image Station 4000MM(日本 NIKON 株式会社);real-time RT-PCR 仪(瑞士 Roche 公司);NaNodrop2000 分光光度计(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及地塞米松的作用

人眼原代小梁细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养,当原代小梁细胞生长达到 80% 融合时进行传代,吸出培养液,用 PBS 轻轻漂洗细胞,去除细胞表面血清成分,吸除 PBS,加入质量分数 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 混合消化液约 1 ml,倒置显微镜下观察细胞形态变化,待看到细胞突起缩回胞体开始收缩变圆时,即刻吸出消化液,加入终止液,用吸管吹打瓶壁使细胞脱落,将细胞悬液收集到离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用培养液重新悬浮细胞,按照 1:2 比例传代,接种到 25 cm² 的培养瓶中,置于细胞培养箱中培养,隔日换液,每天观察细胞的生长情况。取 0.2 mg 地塞米松用无水乙醇溶解,用含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行配制,终浓度为 1×10⁻⁵、1×10⁻⁶ 和 1×10⁻⁷ mol/L,正常对照组细胞培养基中加入相同比例无水乙醇,各组细胞均培养 4 d,隔日换液。采用免疫荧光技术检测和定位各组细胞中 TRPM7 的表达,质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,用山羊血清封闭 30 min,加入鼠抗 TRPM7 单克隆抗体(NBP2-12906,1:100),阴性对照片用 PBS 代替一抗,4℃ 下孵育过夜,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加入 Alexa Flour 488(1:200)荧光二抗,室温下避光孵育 60 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加入 Hoechst,室温下避光孵育 5 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察和定位细胞中 TRPM7 的表达。

1.2.2 TRPM7-siRNA 转染小梁细胞

将培养的小梁细胞分为 TRPM7-siRNA1 转染组、TRPM7-siRNA2 转染组、siRNA 转染组和正常对照组,各转染组分别取 2 个 1.5 ml EP 管,分别加入 145 μl 和 140 μl Opti-MEM 无血清培养基,TRPM7-siRNA1 和 TRPM7-siRNA2 转染组分别向 2 个管加入 Lipofectamine RNAiMAX 5 μl 和 TRPM7-siRNA1/2 10 μl,siRNA 转染组向 2 个管加入 Lipofectamine RNAiMAX 5 μl 和 Ctl-siRNA 10 μl,正常对照组不添加转染试剂,用枪头轻轻混匀并静置 5 min,滴入培养皿中并室温孵育 20 min,用胰蛋白酶消化培养瓶中的小梁细胞,将细胞悬浮液加于混合液上面,孵育 96 h。采用 Western blot 法检测各组细胞中 TRPM7 蛋白相对表达量,测定和计算方法同 1.2.1,以筛选

TRPM7-siRNA 干扰片段。本实验所用的 siRNA 片段见表 1。

表 1 siRNA 片段序列

siRNA 片段	序列 (5'-3')
siRNA1	F:CGAAGACACUCAUGAAGUAAdTdT R:dTdTGCCUUCUGUGAGUACUUCAU
siRNA2	F:GGAUAGAGUUGCAUUGUAAdTdT R:dTdTCCUAUCUCAACGUAACAAU

注:siRNA:小干扰 RNA

1.2.3 免疫荧光染色检测小梁细胞中 Phalloidin 和 Vinculin 的表达

传代细胞接种于无菌盖玻片上并分为正常对照组、TRPM7-siRNA2 转染组、地塞米松处理组、TRPM7-siRNA2+地塞米松组,将盖玻片置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,用质量分数 0.1% Triton X-100 室温下打孔 5 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,用山羊抗兔血清封闭 30 min,TRPM7-siRNA2 转染组、地塞米松作用组和 TRPM7-siRNA2+地塞米松组加入兔抗 Vinculin 单克隆抗体(1:100),阴性对照组用 PBS 代替一抗,4℃ 下孵育过夜,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加入 Alexa Flour 488(1:200)和 PhalloidinCy3 荧光二抗,室温下避光孵育 60 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加入 DAPI,室温下避光孵育 5 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 Western blot 法检测细胞中 TRPM7、p-Cofilin 和 Cofilin 蛋白的表达

用蛋白裂解液裂解正常对照组和 1×10⁻⁷、1×10⁻⁶、1×10⁻⁵ mol/L 地塞米松作用组,siRNA 转染组和 TRPM7-siRNA1/2 作用组,提取各组蛋白,采用 BCA 法检测蛋白质量浓度,行 SDS-PAGE 电泳,PVDF 膜转印蛋白。用快速封闭液(1:100)封闭 5 min,分别加入 TRPM7、磷酸化 Cofilin(p-Cofilin)和 Cofilin(美国 Abcam 公司)一抗,工作浓度均为 1:500,4℃ 孵育过夜。次日用 TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,用山羊抗兔二抗室温下孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,浸泡于 Millipore 曝光液,用 Kodak Image Station 4000MM(美国柯达公司)检测。TRPM7 蛋白检测以 Tubulin 作为内参,p-cofilin 和 cofilin 蛋白检测以 β-actin 作为内参。采用 Image J 成像分析软件测定 TRPM7 蛋白、p-cofilin 和 cofilin 蛋白表达灰度值。TRPM7 蛋白相对表达量=各组 TRPM7 蛋白表达灰度值/Tubulin 表达灰度值;p-cofilin 蛋白相对表达量=各组 p-cofilin 蛋白表达灰度值/β-actin 表达灰度值。

1.2.5 免疫荧光法检测细胞的细胞质中钙离子荧光

强度 将培养的细胞接种于激光扫描共焦显微镜专用培养皿进行培养, siRNA 转染组和 TRPM7-siRNA2 转染组培养 96 h, 地塞米松正常对照组和处理组培养 4 d; TRPM7 抑制剂 2-氨基乙酯二苯基硼酸(2-APB) 正常对照组和处理组、钙离子螯合剂乙二醇二乙醚二胺四乙酸

(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA) 正常对照组和处理组培养, 分别在培养基中添加相应制剂作用 5 min, 用 Hanks 液漂洗 3 次, 将 Fluo-3AM 用 DMEM 稀释为终浓度 20 $\mu\text{mol/L}$, 置于 CO_2 培养箱中避光孵育 1 h, 用 Hanks 漂洗 3 次, 荧光显微镜下观察细胞内钙离子的荧光强度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组多水平研究设计, 不同组间细胞中 TRPM7 蛋白相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。TRPM7 siRNA 转染组与 siRNA 转染组间细胞中 p-cofilin 蛋白相对表达量的差异比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量地塞米松作用组细胞中 TRPM7 的表达

TRPM7 主要分布于小梁细胞的胞质膜, 呈绿色荧光, 细胞核中未见 TRPM7 表达(图 1)。 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L 地塞米松作用组小梁细胞中 TRPM7 蛋白条带表达强度量随着地塞米松剂量的增加而逐渐降低, 正常对照组及 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L 地塞米松作用组 TRPM7 表达的灰度值分别为 0.347 ± 0.303 、 0.203 ± 0.198 、 0.068 ± 0.051 和 0.043 ± 0.022 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 4.210$, $P = 0.046$); 与对照组比较, 1×10^{-7} mol/L 地塞米松作用组和 1×10^{-6} mol/L 地塞米松作用组细胞中 TRPM7 蛋白相对表达量的差异均无统计学意义 ($t = 0.726$, $P = 0.488$; $t = 2.006$, $P = 0.080$), 1×10^{-5} mol/L 地塞米松组细胞中 TRPM7 蛋白相对表达量明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t = 3.292$, $P = 0.011$) (图 2)。

2.2 不同 siRNA 转染组小梁细胞中 TRPM7 蛋白表达

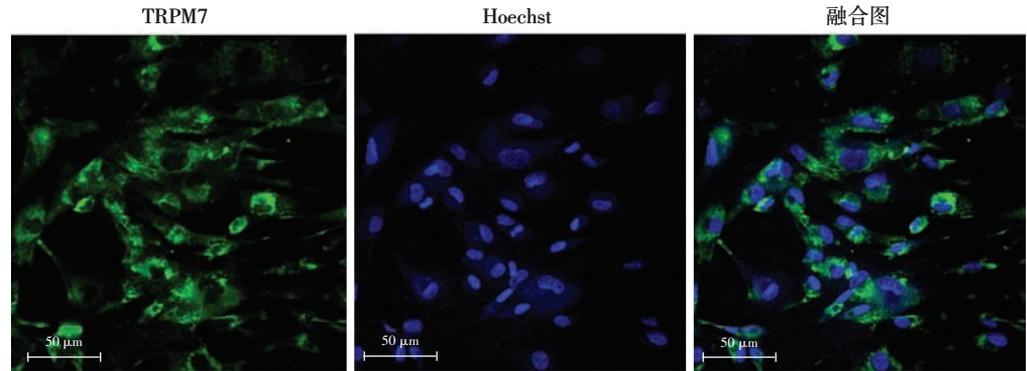


图 1 TRPM7 在人眼小梁细胞的表达及定位(标尺 = 50 μm) 小梁细胞中的 TRPM7 蛋白呈绿色荧光(鼠抗 TRPM7 单克隆抗体), 细胞核呈蓝色荧光(Hoechst)

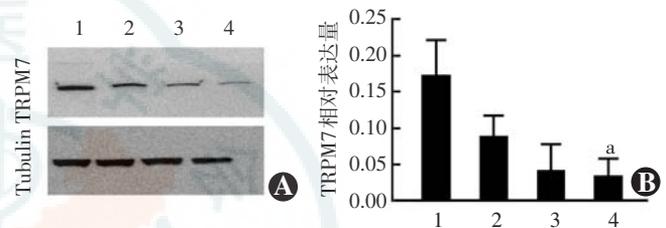


图 2 Western blot 法检测不同剂量地塞米松作用组小梁细胞中 TRPM7 蛋白的表达变化 A: 不同剂量地塞米松作用组小梁细胞中 TRPM7 蛋白表达电泳图 B: 各组小梁细胞中 TRPM7 相对蛋白表达量的量化比较 $F = 4.210$, $P = 0.046$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) 1: 正常对照组; 2: 1×10^{-7} mol/L 地塞米松作用组; 3: 1×10^{-6} mol/L 地塞米松作用组; 4: 1×10^{-5} mol/L 地塞米松作用组 TRP: 瞬时受体电位

比较

各组细胞转染后 96 h, 光学显微镜下可见 TRPM7-siRNA 转染组小梁细胞胞体略变大, 细胞突起变短, siRNA 转染组小梁细胞胞体呈梭型, 细胞突起较长(图 3A, B), 与 1×10^{-5} mol/L 地塞米松作用小梁细胞 4 d 后的改变类似(图 3C, D)。正常对照组、siRNA 转染组、TRPM7-siRNA1 转染组和 TRPM7-siRNA2 转染组小梁细胞中 TRPM7 蛋白条带表达强度依次减弱(图 3E), 各组细胞中 TRPM7 蛋白相对表达量分别为 0.494 ± 0.204 、 0.406 ± 0.050 、 0.104 ± 0.064 和 0.078 ± 0.047 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 9.891$, $P = 0.005$)。与 siRNA 转染组比较, 正常对照组细胞中 TRPM7 蛋白相对表达量的差异无统计学意义 ($t = -0.330$, $P = 0.750$), TRPM7-siRNA1 转染组和 TRPM7-siRNA2 转染组细胞中 TRPM7 蛋白相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = -3.650$, $P = 0.006$; $t = -4.313$, $P = 0.003$) (图 3F)。

2.3 不同细胞处理组小梁细胞中 Phalloidin 和 Vinculin 的表达及定位

荧光显微镜下可见正常对照组细胞中 Vinculin 呈绿色荧光, Phalloidin 呈红色荧光, 均分布于细胞质。

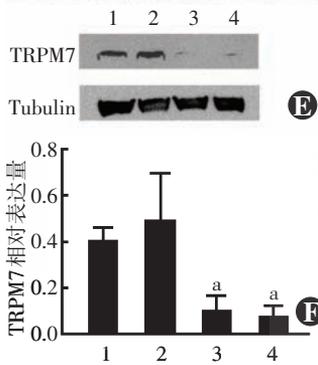
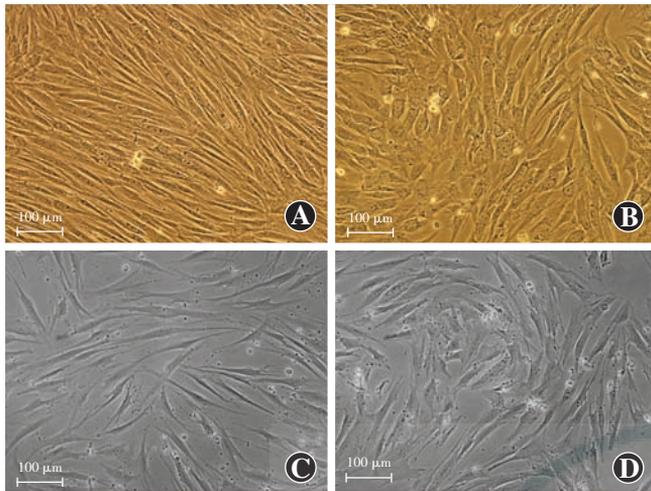


图 3 不同 siRNA 转染组小梁细胞的形态及细胞中 TRPM7 蛋白的表达 A: siRNA 转染组小梁细胞胞体呈梭型 (标尺 = 100 μm) B: TRPM7-siRNA 转染组小梁细胞胞体变大 (标尺 = 100 μm) C: 地塞米松对照组小梁细胞胞体呈梭形 (标尺 = 100 μm) D: 地塞米松作用组小梁细胞胞体变大 (标尺 = 100 μm) E: Western blot 电泳图显示未转染组和 siRNA 转染组细胞中 TRPM7 蛋白表达条带增强, 而 TRPM7-siRNA1 转染组和 TRPM7-siRNA2 转染组细胞中 TRPM7 蛋白表达条带减弱 F: 各组细胞中 TRPM7 蛋白相对表达量的量化比较 $F=9.891$, $P=0.005$. 与 1×10^{-5} mol/L siRNA 转染组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=3$) 1: 正常对照组; 2: siRNA 转染组; 3: TRPM7-siRNA1 转染组; 4: TRPM7-siRNA2 转染组 TRP: 瞬时受体电位

TRPM7-siRNA2 转染组细胞中 Vinculin 和 Phalloidin 荧光强度均减弱, 且可见细胞骨架纤维变细; 1×10^{-5} mol/L 地塞米松组细胞中 Vinculin 和 Phalloidin 荧光均增强, 骨架纤维增多增粗; TRPM7-siRNA2+地塞米松组细胞中 Vinculin 和 Phalloidin 荧光强度明显弱于 1×10^{-5} mol/L 地塞米松组, 细胞骨架纤维明显变细 (图 4)。

2.4 不同处理组细胞中钙离子荧光强度变化

免疫荧光结果显示, 正常对照组小梁细胞的细胞质中钙离子呈绿色荧光, 1×10^{-5} mol/L 地塞米松处理组小梁细胞的细胞质内钙离子荧光强

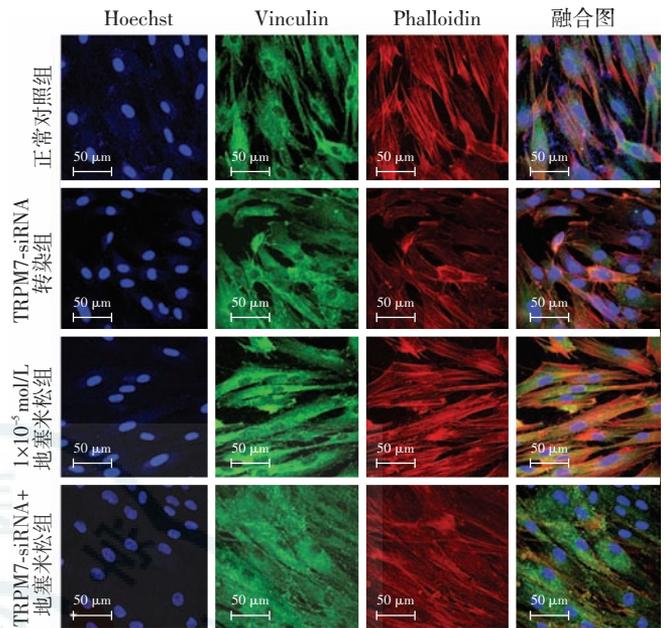


图 4 不同处理组小梁细胞中 Vinculin 和 Phalloidin 表达强度变化 (标尺 = 50 μm) 正常对照组细胞的细胞质中 Vinculin 呈绿色荧光 (Alexa Flour 488), Phalloidin 呈红色荧光 (Cy3), 细胞核呈蓝色荧光 (Hoechst), TRPM7-siRNA2 转染组细胞中 Vinculin 和 Phalloidin 荧光强度均减弱, 1×10^{-5} mol/L 地塞米松组细胞中 Vinculin 和 Phalloidin 荧光均增强, TRPM7-siRNA2+地塞米松组细胞中 Vinculin 和 Phalloidin 荧光强度明显弱于 1×10^{-5} mol/L 地塞米松组 Vinculin: 黏着斑蛋白; Phalloidin: 鬼笔环肽; TRP: 瞬时受体电位; siRNA: 小干扰 RNA

度较正常对照组明显减弱, 2-APB 处理组细胞中钙离子荧光强度与正常对照组接近, EGTA 处理组细胞中钙离子荧光强度略增强, TRPM7-siRNA2 转染组细胞中钙离子荧光强度明显弱于 siRNA 转染组 (图 5)。

2.5 不同转染组细胞中 p-coniflin 和 coniflin 蛋白表达的比较

siRNA 转染组和 TRPM7-siRNA2 转染组小梁细胞

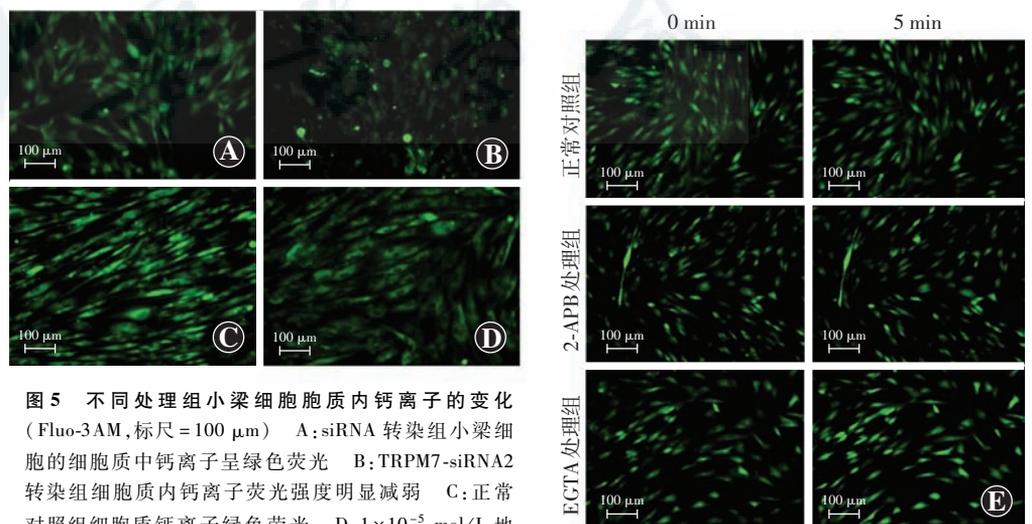


图 5 不同处理组小梁细胞胞质内钙离子的变化 (Fluo-3AM, 标尺 = 100 μm) A: siRNA 转染组小梁细胞的细胞质中钙离子呈绿色荧光 B: TRPM7-siRNA2 转染组细胞质内钙离子荧光强度明显减弱 C: 正常对照组细胞质钙离子绿色荧光 D: 1×10^{-5} mol/L 地塞米松处理组小梁细胞细胞质内钙离子荧光强度比正常对照组明显减弱 E: 2-APB 处理组小梁细胞细胞质内钙离子荧光强度与正常对照组接近, EGTA 处理组处理后 5 min 小梁细胞细胞质内钙离子荧光强度略强于正常对照组 TRP: 瞬时受体电位; siRNA: 小干扰 RNA; 2-APB: 氨基乙基二苯硼酸酯; EGTA: 乙二醇二乙醚二胺四乙酸

中 p-cofilin 相对蛋白表达量分别为 0.317 ± 0.031 和 0.092 ± 0.071 , TRPM7-siRNA2 转染组细胞中 p-cofilin 蛋白相对表达量明显低于 siRNA 转染组, 差异有统计学意义 ($t=5.030, P=0.007$), 但总 cofilin 未见明显改变(图 6)。

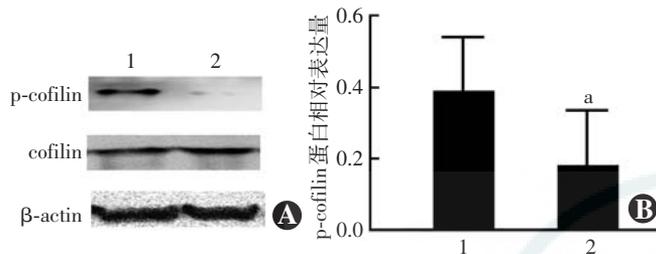


图 6 Western blot 检测的不同转染组小梁细胞中 p-cofilin 蛋白的表达 A: cofilin 和 p-cofilin 蛋白表达电泳图 siRNA 转染组与 TRPM7-siRNA2 转染组细胞中 cofilin 蛋白条带表达强度一致, TRPM7-siRNA2 转染组细胞中 p-cofilin 蛋白条带表达强度明显弱于 siRNA 转染组 B: siRNA 转染组与 TRPM7-siRNA2 转染组细胞中 p-cofilin 蛋白相对表达量的量化比较 与 siRNA 转染组比较, $^*P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n=3$) 1: siRNA 转染组; 2: TRPM7-siRNA2 转染组 cofilin: 丝切蛋白; p-cofilin: 磷酸化丝切蛋白

3 讨论

研究表明,小梁细胞骨架蛋白及其收缩特性的改变影响眼房水的流动^[17]。目前糖皮质激素诱导的青光眼发病机制尚未完全阐明,有文献报道多个 TRP 家族成员参与小梁细胞的功能调控过程,如 TRPC,但 TRPM7 的表达及其功能变化是否参与小梁细胞功能的调控仍鲜有研究报道^[18]。此外,研究也表明地塞米松可诱导小梁细胞的骨架重塑功能增强^[10-11],因此本研究建立地塞米松刺激小梁细胞骨架重塑模型,发现地塞米松刺激小梁细胞后 4 d 细胞体积变大,细胞质增多,细胞中 TRPM7 蛋白表达下调,说明 TRPM7 蛋白受地塞米松的负向调节。本研究通过 TRPM7-siRNA 转染小梁细胞以沉默 TRPM7 表达,发现 TRPM7-siRNA 转染组细胞形态伸展变宽。曾有研究显示干扰 HEK-293 细胞和 NIE-115 细胞中 TRPM7 的表达后细胞延展性更好^[19-20],与本研究结果相符,说明 TRPM7 与细胞的黏附功能有关,下调细胞中 TRPM7 的表达可增强细胞的黏附作用。本研究中还发现,地塞米松处理组小梁细胞中骨架蛋白表达增加,骨架纤维明显增多、增粗,细胞中黏着斑蛋白 vinculin 增多,而 TRPM7-siRNA 转染组细胞中骨架纤维变少、变细, vinculin 蛋白增多不明显,因为地塞米松是通过多种机制综合作用于细胞骨架结构,而 TRPM7 可能主要对纤维状肌动蛋白(F-actin)有影响,但具体机制仍有待进一步研究。

本研究尝试将地塞米松与 TRPM7-siRNA 同时作用于小梁细胞,发现细胞中细胞骨架变化与 TRPM7-siRNA 组类似,然而 vinculin 蛋白多于 TRPM7-siRNA 转染组,此外发现单纯地塞米松处理组细胞中 TRPM7 表达的下调幅度低于 TRPM7-siRNA 转染组,而当两者共同作用时 TRPM7 表达的下调幅度与单纯 TRPM7-siRNA 转染组相似,因此本研究中推测 siRNA 对 TRPM7 表达的下调作用已达到最强。

作为房水外流通路的一个关键部位,小梁网一直处于眼压调控的紧张状态。眼压的改变,特别是病理状态下的眼压改变,需要小梁网细胞改变其自身的一些特性来适应压力变化。已有文献报道,在青光眼动物模型和高眼压细胞模型中,眼压升高常伴随着小梁网细胞外钙离子内流,小梁网细胞内钙离子浓度增加^[21]。本研究发现,分别用地塞米松或 TRPM7-siRNA 处理后小梁细胞胞内钙离子明显减少,这些结果提示 TRPM7 功能损伤会影响小梁细胞钙离子的内流,但是 TRPM7 下调钙离子水平对眼压调控的意义有待进一步阐释。研究发现,在人胎肺成纤维细胞上 TRPM7 通过钙离子内流引起细胞钙闪烁^[22],改变细胞骨架形态,促进其定向迁移活动,说明细胞内钙离子水平与细胞骨架改变存在一定的关系。另外,与 EGTA 处理组比较,地塞米松处理组或 TRPM7-siRNA 转染组细胞中钙离子的减少也提示可能存在内质网失代偿机制^[23]。本研究中在观察 TRPM7 C 端蛋白磷酸激酶对小梁细胞 cofilin 作用时发现,TRPM7-siRNA 转染组细胞内 p-cofilin 明显低于 siRNA 转染组,说明 TRPM7 磷酸酶对小梁细胞骨架蛋白有影响,引起 cofilin 蛋白与肌动蛋白纤维结合增多,促进肌动蛋白聚合体的解聚^[24-27]。以上研究结果说明,TRPM7 通过钙离子通道和 C 端蛋白磷酸激酶对小梁细胞骨架发挥一定的调控作用。

本研究中采用地塞米松处理的小梁细胞骨架重塑模型阐述小梁细胞中 TRPM7 参与细胞骨架调控及其调节机制,结果发现当小梁细胞中 TRPM7 表达下调可通过降低 p-cofilin 使细胞肌动蛋白解聚,从而调控细胞骨架张力纤维的重塑,同时能下调胞内钙离子水平。本研究结果有助于进一步加深对地塞米松引起的小梁细胞骨架张力纤维的聚集紊乱这一病理过程的认识,其结果仍有待进一步通过动物体内实验加以证实。

参考文献

- [1] Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma [J]. Arch Ophthalmol, 2002, 120 (6): 714-720. discussion 829-830.

- [2] Tian B, Geiger B, Epstein DL, et al. Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(3): 619-623.
- [3] Clark AF, Brothie D, Read AT, et al. Dexamethasone alters F-actin architecture and promotes cross-linked actin network formation in human trabecular meshwork tissue [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2005, 60(2): 83-95. DOI:10.1002/cm.20049.
- [4] Zhou L, Li Y, Yue BY. Glucocorticoid effects on extracellular matrix proteins and integrins in bovine trabecular meshwork cells in relation to glaucoma [J]. *Int J Mol Med*, 1998, 1(2): 339-346.
- [5] Pattabiraman PP, Epstein DL, Rao PV. Regulation of adherens junctions in trabecular meshwork cells by Rac GTPase and their influence on intraocular pressure [J]. *J Ocul Biol*, 2013, 1(1). DOI: 10.13188/2334-2838.1000002.
- [6] Inoue T, Tanihara H. Rho-associated kinase inhibitors: a novel glaucoma therapy [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 37: 1-12. DOI:10.1016/j.preteyeres.2013.05.002.
- [7] Iyer P, Maddala R, Pattabiraman PP, et al. Connective tissue growth factor-mediated upregulation of neuromedin U expression in trabecular meshwork cells and its role in homeostasis of aqueous humor outflow [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(8): 4952-4962. DOI:10.1167/iovs.12-9681.
- [8] Wordinger RJ, Clark AF. Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma [J]. *Prog Retin Eye Res*, 1999, 18(5): 629-667.
- [9] Underwood JL, Murphy CG, Chen J, et al. Glucocorticoids regulate transendothelial fluid flow resistance and formation of intercellular junctions [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(2 Pt 1): C330-342.
- [10] Clapham DE. TRP channels as cellular sensors [J]. *Nature*, 2003, 426(6966): 517-524. DOI:10.1038/nature02196.
- [11] Su LT, Liu W, Chen HC, et al. TRPM7 regulates polarized cell movements [J]. *Biochem J*, 2011, 434(3): 513-521. DOI:10.1042/BJ20101678.
- [12] Liu YS, Liu YA, Huang CJ, et al. Mechanosensitive TRPM7 mediates shear stress and modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells through Osterix pathway [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16522 [2017-01-03]. DOI:10.1038/srep16522. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558702>.
- [13] Stritt S, Nurdan P, Favier R, et al. Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg(2+) homeostasis and cytoskeletal architecture [J/OL]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11097 [2017-01-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27020697>. DOI:10.1038/ncomms11097.
- [14] Zhao PY, Gan G, Peng S, et al. TRP channels localize to subdomains of the apical plasma membrane in human fetal retinal pigment epithelium [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(3): 1916-1923. DOI:10.1167/iovs.14-15738.
- [15] Gilliam JC, Wensel TG. TRP channel gene expression in the mouse retina [J]. *Vision Res*, 2011, 51(23-24): 2440-2452. DOI:10.1016/j.visres.2011.10.009.
- [16] Parnas M, Peters M, Dadon D, et al. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels [J]. *Cell Calcium*, 2009, 45(3): 300-309. DOI:10.1016/j.ceca.2008.11.009.
- [17] Quigley HA. Open-angle glaucoma [J]. *N Engl J Med*, 1993, 328(15): 1097-1106.
- [18] Abad E, Lorente G, Gavara N, et al. Activation of store-operated Ca(2+) channels in trabecular meshwork cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(2): 677-686. DOI:10.1167/iovs.07-1080.
- [19] Su LT, Chen HC, González-Pagán O, et al. TRPM7 activates m-calpain by stress-dependent stimulation of p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase [J]. *J Mol Biol*, 2010, 396(4): 858-869. DOI:10.1016/j.jmb.2010.01.014.
- [20] Clark K, Langeslag M, van Leeuwen B, et al. TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion [J]. *EMBO J*, 2006, 25(2): 290-301. DOI:10.1038/sj.emboj.7600931.
- [21] Polansky JR, Wood IS, Maglio MT, et al. Trabecular meshwork cell culture in glaucoma research: evaluation of biological activity and structural properties of human trabecular cells *in vitro* [J]. *Ophthalmology*, 1984, 91(6): 580-595.
- [22] Wei C, Wang X, Chen M, et al. Calcium flickers steer cell migration [J]. *Nature*, 2009, 457(7231): 901-905. DOI:10.1038/nature07577.
- [23] Yazawa M, Ferrante C, Feng J, et al. TRIC channels are essential for Ca2+ handling in intracellular stores [J]. *Nature*, 2007, 448(7149): 78-82. DOI:10.1038/nature05928.
- [24] Hotulainen P, Paunola E, Vartiainen MK, et al. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(2): 649-664. DOI:10.1091/mbc.E04-07-0555.
- [25] Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(2): 457-469. DOI:10.1016/j.cellsig.2012.11.001.
- [26] Gu J, Lee CW, Fan Y, et al. ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity [J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(10): 1208-1215. DOI:10.1038/nn.2634.
- [27] Ye Y, Yang Y, Cai X, et al. Down-regulation of 14-3-3 Zeta inhibits TGF-β1-induced actomyosin contraction in human trabecular meshwork cells through RhoA signaling pathway [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(2): 719-730. DOI:10.1167/iovs.15-17438.

(收稿日期:2017-02-10 修回日期:2018-03-02)

(本文编辑:尹卫靖)

· 病例报告 ·

额颧缝附近孤立性纤维脂肪瘤一例

孙亚杰 林婷婷 何彦津

300000 天津医科大学眼科医院(现在天津爱尔眼科医院)

通信作者:林婷婷, Email: ltt6123@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.04.007

基金项目:天津市自然科学基金青年项目(16JCQNJC12300);天津医科大学眼科研究所科研临床基金项目(15YKYJS003)

患者,女,60岁,右眼眶外上方肿物15年,进行性体积增大3年,于2016年11月1日在天津医科大学眼科医院就诊。眼

科检查:视力右眼0.8,矫正后1.0,左眼0.8,矫正后1.0;眼压右眼17.1 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa),左眼16.4 mmHg。右