

· 实验研究 ·

紫外线照射诱导的人晶状体上皮细胞中谷氧还蛋白 2 上调对细胞凋亡的抑制作用

郭辰峻 郭勇 王嵩 张婕 严宏

710038 西安,空军军医大学唐都医院眼科(郭辰峻、郭勇、王嵩、张婕、严宏);400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科(严宏)

通信作者:严宏,Email:yhongb@fmmu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.03.003

【摘要】目的 观察不同能量紫外线(UV)B照射对人晶状体上皮细胞(LECs)的损伤作用及细胞线粒体中谷氧还蛋白 2(Grx2)的表达变化,探讨 Grx2 对 UVB 诱导的人 LECs 凋亡的抑制作用。**方法** 对 HLE-B3 进行体外培养,以不同能量的 UVB(0、10、30、50 mJ/cm²) (波长 297 nm) 分别照射培养的细胞,分别于照射后 2、4、8、12 和 16 h 在光学显微镜下观察细胞形态变化;采用细胞计数试剂盒 8(CCK8)法检测各组细胞的存活率;采用 TUNEL 法测定各组细胞的凋亡率;分别采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测各组细胞中 Grx2 mRNA 及其蛋白的相对表达量。用 pcDNA3.1-Grx2 质粒转染培养的细胞构建 Grx2 过表达模型,以 pcDNA3.1 空质粒转染组作为对照,并以 UVB 照射转染的细胞,采用 TUNEL 法检测各组细胞的凋亡率。**结果** 细胞培养过程中未照射组细胞贴壁生长,细胞伸展良好,细胞中 Grx2 表达呈绿色荧光。UVB 照射的细胞皱缩变小,死亡细胞增多,10、30、50 mJ/cm² UVB 照射后随着 UVB 剂量增加和照射时间延长细胞存活率逐渐下降,凋亡细胞逐渐增多。10 mJ/cm² UVB 照射组和 30 mJ/cm² UVB 照射组照射后 4 h,细胞中 Grx2 mRNA 相对表达量分别为 2.53±0.48 和 3.53±0.14,均明显高于未照射组的 1.01±0.08 和 1.00±0.09,50 mJ/cm² UVB 照射组照射后 1 h 细胞中 Grx2 mRNA 相对表达量为 15.30±3.01,明显高于未照射组的 1.00±0.07,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);各照射不同时间后细胞中 Grx2 蛋白相对表达量变化趋势与 mRNA 相同。50 mJ/cm² UVB 照射后 4 h Grx2 转染组细胞凋亡率为 (15.34±1.71)%,明显低于空质粒组的 (22.11±2.46)%,差异有统计学意义($t = 3.189, P < 0.05$)。**结论** 不同能量 UVB 照射后诱导的人 LECs 凋亡和损伤程度呈 UVB 能量依赖性和照射时间依赖性,各剂量 UVB 照射 LECs 后细胞中 Grx2 表达量均表现为一过性上调,Grx2 表达量增加对 UVB 诱导人 LECs 凋亡有抑制作用。

【关键词】 紫外线/不良反应; 上皮细胞; 晶状体; 谷氧还蛋白; 凋亡/辐射作用; 培养细胞; 人
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81570823)

Protection effects of glutathione 2 on human lens epithelial cells against ultraviolet radiation-induced apoptosis

Guo Chenjun, Guo Yong, Wang Song, Zhang Jie, Yan Hong

Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, China (Guo CJ, Guo Y, Wang S, Zhang J, Yan H); Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China (Yan H)

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

[Abstract] Objective To observe the damage of human lens epithelial cells (LECs) induced by ultraviolet (UV)B radiation and the expression changes of glutaredoxin 2 (Grx2) in the cells, and to investigate the protective effects of Grx2 on human LECs against UVB-induced apoptosis. **Methods** Human LECs (HLE-B3) were cultured and exposed to different energy of UVB (0, 10, 30, 50 mJ/cm²) with the wavelength of 297 nm. The morphology of the cells was examined under the optical microscope 2, 4, 8, 12 and 16 hours after irradiation of UVB. The survival rate of the cells was evaluated with cell counting kit 8 (CCK8). The apoptosis rate of the cells was detected by TUNEL assay. Real-time quantitative PCR and Western blot were employed to detect the expressions of Grx2 mRNA and Grx2 protein in the cells, respectively. The cells were transfected with pcDNA3.1-Grx2 plasmid by lipofectamine 2000 as the Grx2 transfected group, and pcDNA3.1 plasmid was transfected into cells as the empty plasmid group. The cells were irradiated by 50 mJ/cm² for 4 hours, and the apoptosis rate of human LECs was detected by TUNEL assay.

Results Cultured cells grew well with the green fluorescence for Grx2 expression in the non-UVB exposure group, and shrinkage and death of the cells were found after UVB irradiation. The survival rate of the cells was gradually reduced after irradiation of 10, 30, 50 mJ/cm² UVB as the increase of UVB energy and lapse of time. The expression level of Grx2 mRNA were 2.53±0.48 and 3.53±0.14 in the 10 mJ/cm² UVB group and 30 mJ/cm² UVB group 4 hours after irradiation, which were significantly higher than 1.01±0.08 and 1.00±0.09 in the non-UVB exposure

group (all at $P < 0.05$). The expression level of Grx2 mRNA in the cells was 15.30 ± 3.01 at 1 hour after irradiation in the 50 mJ/cm^2 UVB group, which was significantly higher than 1.00 ± 0.07 in the non-UVB exposure group ($P < 0.05$). The expression levels of Grx2 protein showed the same tendency to Grx2 mRNA. The apoptosis rate of the cells in the Grx2 transfected group was $(15.34 \pm 1.71)\%$, and that in the empty plasmid group was $(22.11 \pm 2.46)\%$ at 4 hours after 50 mJ/cm^2 UVB irradiation, with a significant difference between them ($t = 3.189, P < 0.05$).

Conclusions UVB irradiation induced damage of human LECs in dose- and time-dependent manner. However, the expression of Grx2 in human LECs is up-regulated transiently after exposure of UVB, which has a protective effect on the cells against the UVB-induced apoptosis.

[Key words] Ultraviolet rays/adverse effects; Epithelial cells; Lens, crystalline; Glutaredoxin; Apoptosis/radiation effects; Cells, cultured; Humans

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

流行病学调查及基础研究表明,白内障的发生与紫外线 (ultraviolet, UV) 辐照损伤有关^[1], 紫外线辐射氧化损伤是白内障形成的重要原因之一。晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 在晶状体代谢中最为活跃, 在维持晶状体的透明性中发挥重要作用。因此, 紫外线对 LECs 的损伤是造成白内障的诱因, 其中 UVB 主要引起 LECs 损伤。LECs 参与晶状体的生长、分化和损伤修复等生物学活动, 且含有丰富的抗氧化损伤的酶系统, 其中谷氧还蛋白 2 (glutaredoxin 2, Grx2) 在细胞的抗氧化损伤过程中具有重要作用。Grx2 是一种小分子氧化还原酶, 属于谷氧还蛋白家族^[2], 可与谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、谷胱甘肽还原酶和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 即还原性辅酶 II (NAPDH), 共同构成 Grx 系统, 与 GSH 结合, 可逆性地调节细胞的 GSH 化、去 GSH 化以及二硫键的形成和还原, 以维持细胞氧化还原稳态^[3]。本研究组前期研究对 UVB 辐照诱导的小鼠白内障的发病机制进行了研究^[4], 为了进一步研究 UVB 辐照与人 LECs 氧化损伤的作用及机制, 本研究对 UVB 诱导的人 LECs 损伤进行 Grx2 检测, 动态观察 UVB 损伤的人 LECs 中 Grx2 的变化, 探讨在 UVB 诱导的白内障形成过程中 Grx2 对 LECs 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 人 LECs 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 (美国 HyClone 公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (以色列 BioInd 公司); 转染试剂 Lipofectamine 2000 (美国 Thermo 公司); 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); HRP 标记山羊抗小鼠二抗 (编号: bs-0296G, 北京博奥森生物技术有限公司); 细胞毒性检测细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试

剂盒、RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术公司); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Promega 公司); UVB 灯 (型号: UVM57, 美国 UVP 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及 UVB 诱导 LECs 损伤模型的建立

依据文献 [4-6] 描述的方法, 用细胞计数板计数 50 万个 HLE-B3 细胞, 铺在 6 cm 培养皿中, 加入 4 ml 含有体积分数 20% FBS 的低糖 DMEM, 置于体积分数 5% CO_2 、 37°C 孵箱中培养 24 h, 在超净台中打开皿盖, 用波长 297 nm 的 UVB 照射细胞, 照射功率为 $55 \mu\text{W/cm}^2$, 分别照射 3、9 和 15 min, 照射能量分别达到 10、30 和 50 mJ/cm^2 。10 mJ/cm^2 和 30 mJ/cm^2 能量组分别于照射后 1、3、4、6、12 和 16 h 用显微镜观察细胞形态。50 mJ/cm^2 能量组分别于照射后 0.5、1、2、3、6 和 8 h 进行观察。未照射组的细胞作为对照。

1.2.2 Grx2 的细胞转染

将细胞铺于 6 孔板中进行培养, 细胞密度达到 70% 时将细胞分为 pcDNA3.1-Grx2 质粒转染组和 pcDNA3.1 空质粒转染组, 分别将 3 μg 相应质粒与 5 μl lipofectamine 2000 混合制备转染液, 静置 20 min; 然后将 6 孔板中细胞培养液换为无血清培养液, 将转染液加入无血清培养液中。细胞放置在 5% CO_2 、 37°C 孵箱中培养, 6 h 后更换为 20% FBS 的低糖 DMEM, 继续培养 48 h, 收集细胞样品待测。

1.2.3 免疫荧光染色法检测细胞中 Grx2 蛋白的表达

将正常培养的细胞铺于 24 孔板, 每孔加入 6×10^4 个细胞, 待贴壁生长后 24 h 用 PBS 清洗 2 遍, 加入质量分数 4% 多聚甲醛中固定 20 min, 加入小鼠抗人 Grx2 抗体 (1:500), 4°C 孵育过夜。PBS 清洗 3 遍, 加入荧光二抗 (1:500), 室温下避光孵育 2 h。PBS 清洗 3 遍, 添加 Hoechst 染核。通过荧光显微镜观察细胞染色

情况。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞的活力 将培养的细胞进行消化并计数,接种至 96 孔板,每孔加入 100 μl 培养液,含 1×10^4 个细胞,培养 12 h,待细胞贴壁后进行 UVB 照射。按照 1.2.1 的描述分组并设定时间点,分别在相应时间点换液,每孔加入 10 μl CCK-8 工作液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 1~4 h,用酶标仪在波长 450 nm 处检测各孔的吸光度值(A)。细胞生存率 = 每孔 A 值/该孔初始 A 值。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡 正常培养的细胞密度达到 80% 时分别用 10、30 和 50 mJ/cm^2 UVB 照射,其中 10 mJ/cm^2 照射组分别于照射后 4.5 h 和 12 h、30 mJ/cm^2 照射组分别于照射后 4 h 和 12 h、50 mJ/cm^2 照射组分别于照射后 1 h 和 6 h 进行观察,未照射组细胞作为对照。预先在 24 孔板中加入载玻片并用多聚赖氨酸包被,细胞消化后单铺于载玻片。待细胞爬片后用 4% 多聚甲醛固定 30 min,然后用体积分数 0.1% Triton X-100 和质量分数 0.1% 柠檬酸三钠水溶液孵育 20 min。每孔加入 1 倍末端转移酶缓冲液 200 μl ,再加入 2 μl 重组末端脱氧核糖核苷酸转移酶和 2 μl 生物素标记的 dUTP (biotin-16-dUTP) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; PBS 洗涤,添加 Avidin-CY3 溶液作用 1 h; Hoechst 染核,体积分数 75% 甘油封片,荧光显微镜下观察并拍照。采用 Image-Pro Plus 计数 TUNEL 阳性细胞比例,每次实验任意选 5 个视野。细胞凋亡率 = 每个视野中的 TUNEL 阳性计数/视野中的全部 hoechst 核信号数目。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 Grx2 mRNA 的表达 参照 1.2.5 中描述的方法根据不同照射能量和时间点进行分组,未照射组细胞作为对照。用 Trizol 法分别在不同时间点提取各组细胞中 RNA,用 TaKaRa 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA 备用。PCR 反应体系: SYBR II 10 μl , 上游引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 和下游引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 0.8 μl , cDNA 模板 2 μl , RNase-free ddH₂O 6.4 μl 。 β -actin 和 Grx2 PCR 引物由北京奥科鼎盛公司设计合成。 β -Actin 和 Grx2 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参照,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 Grx2 mRNA 的相对表达量。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.7 Western blot 法检测细胞中 Grx2 蛋白的表达 按照 1.2.5 中描述的方法根据不同照射能量和时间点进行分组,未照射组细胞作为对照。各组细胞分别于 UVB 处理后不同时间点弃上清培养液, PBS 洗涤

1 次;加入 150 μl RIPA 裂解液,同时加入 1:100 苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 进行裂解;RIPA 裂解后采用 BCA 法进行蛋白定量,于细胞裂解液中加入 5 倍 SDS 上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min,行常规聚丙烯酰胺凝胶电泳,并将蛋白转印至 PVDF 膜上,相应抗体孵育并显色。采用 Image-J 软件检测条带灰度值,以 β -actin 为内参,计算 Grx2 蛋白相对表达量。实验重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组多水平研究设计,各 UVB 照射组照射前后不同时间的细胞凋亡率和 Grx2 蛋白相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析;各能量 UVB 照射组细胞照射前及照射后 Grx2 mRNA 相对表达量总体差异比较采用区组设计两因素方差分析;多重比较采用 SNK-*q* 检验;UVB 照射后空质粒组和 Grx2 转染组间细胞凋亡率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 各组 HLE-B3 形态变化

未照射组细胞贴壁生长,细胞培养液清亮,细胞伸展良好,边界清晰(图 1A),细胞中 Grx2 表达为绿色荧光,细胞核为蓝色荧光(图 1B)。UVB 照射的细胞皱缩变小,培养液中漂浮的死亡细胞增多。10 mJ/cm^2 UVB 照射组照射后 4~6 h 细胞体积缩小,出现死亡细胞,照射后 12 h 细胞数量减少。30 mJ/cm^2 UVB 照射组照射后 4 h 即可见细胞体积缩小,照射后 6~12 h 出现大量死亡细胞;50 mJ/cm^2 UVB 照射组照射后 1~2 h 即出现细胞形态改变,并可见死亡细胞,照射后 6 h 大多数细胞死亡(图 2)。

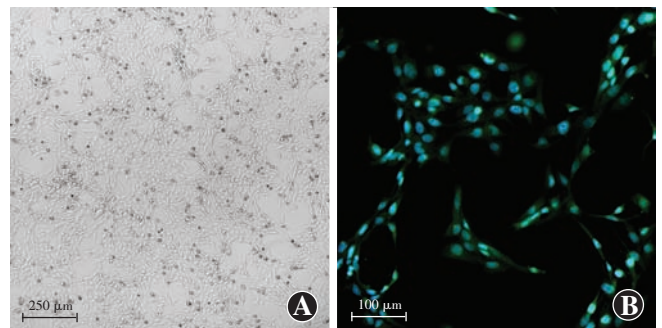


图 1 正常培养的 HLE-B3 细胞形态及 Grx2 表达 A: 光学显微镜下观察细胞贴壁生长,细胞伸展良好(标尺 = 250 μm) B: 荧光显微镜下观察细胞中 Grx2 表达阳性,呈绿色荧光(FITC),细胞核呈蓝色荧光(Hoechst)(标尺 = 100 μm)

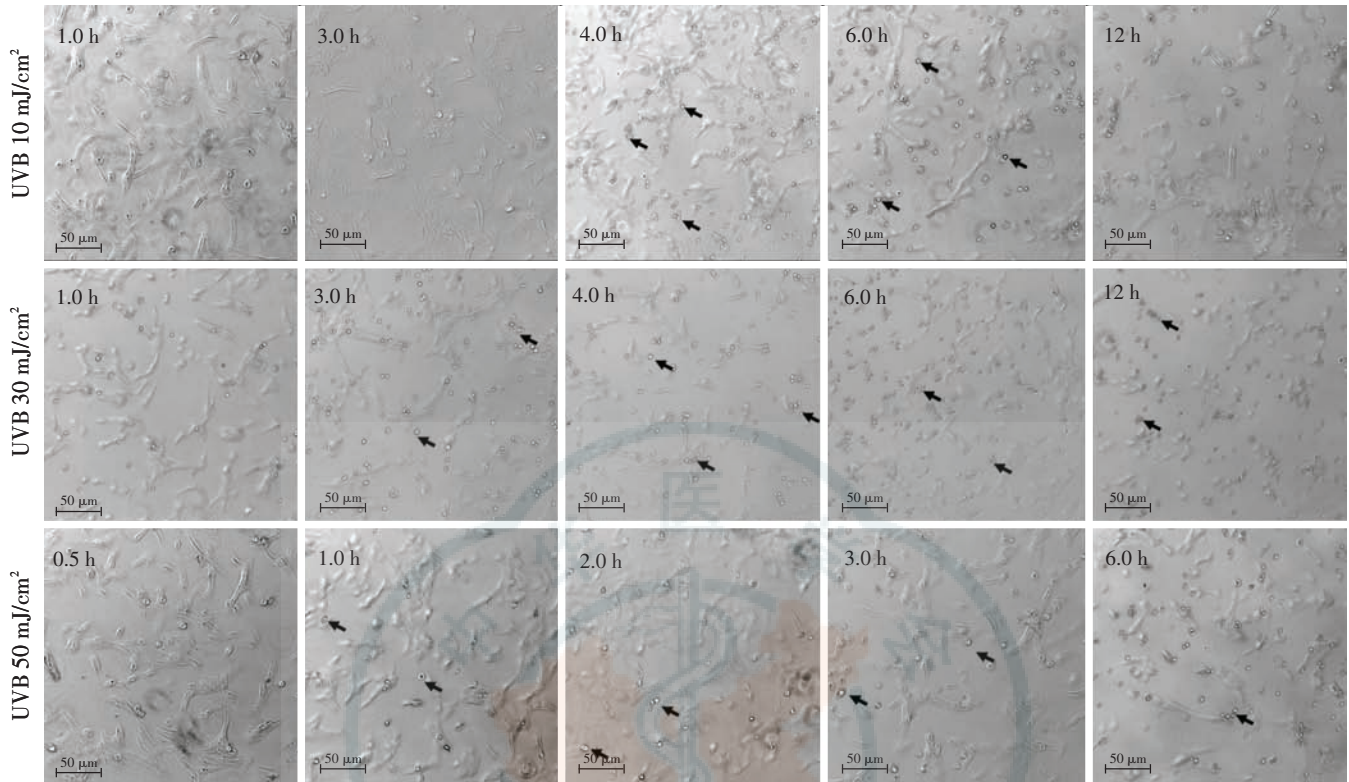


图 2 不同能量 UVB 照射后不同时间点 HLE-B3 细胞的形态改变 (标尺 = 50 μm) 10 mJ/cm² UVB 照射组照射后 1 h 细胞体积较大, 3~6 h 细胞体积缩小, 出现死亡细胞; 30 mJ/cm² UVB 照射组照射后 1 h 细胞数量较 10 mJ/cm² UVB 照射组减少, 照射后 4 h 可见细胞体积缩小, 照射后 6~12 h 出现大量死亡细胞; 50 mJ/cm² UVB 照射组照射后 1~2 h 即出现细胞形态改变, 并可见死亡细胞, 照射后 6 h 大多数细胞死亡 箭头示死亡细胞

2.2 各组细胞活力变化趋势

各照射组随着培养时间延长细胞生存率持续增高; 10 mJ/cm² UVB 照射组照射后 4 h 细胞生存率与未照射组接近, 照射后 8、12 和 16 h 逐渐下降, 照射后 24 h 细胞生存率降至 (37.05 ± 4.23)% ; 30 mJ/cm² UVB 组细胞照射后 4 h 细胞生存率即开始下降, 照射后 12 h 和 16 h 逐渐下降, 照射后 24 h 降至 (24.71 ± 3.31)% ; 50 mJ/cm² UVB 组细胞照射后 4 h 细胞生存率即开始急剧下降, 照射后 12 h 降至 (16.41 ± 5.12)% (图 3)。

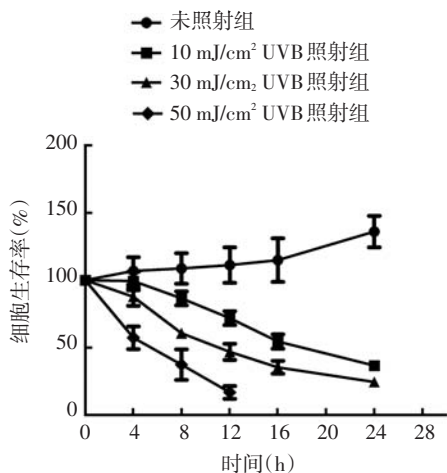


图 3 不同能量 UVB 照射不同时间后 HLE-B3 细胞生存率变化趋势 未照射组细胞随着培养时间延长细胞生存率逐渐升高, 随着 UVB 照射能量的增加和照射时间的延长, 细胞生存率均逐渐下降, 细胞生存率的下降程度呈 UVB 剂量依赖性和时间依赖性 UV: 紫外线

2.3 各组 HLE-B3 凋亡率情况

TUNEL 检测显示, 荧光显微镜下调亡细胞呈红色荧光, 细胞核呈蓝色荧光。未照射组及 10 mJ/cm² UVB 照射组照射 4.5 h 和 30 mJ/cm² UVB 照射组照射 4 h 仅见少量凋亡细胞, 照射后 12 h 凋亡细胞明显增多, 而 50 mJ/cm² UVB 照射组照射后 1~6 h 均可见大量凋亡细胞 (图 4)。未照射组 TUNEL 阳性细胞率为 (3.44 ± 0.33)% ; 10 mJ/cm² UVB 照射组照射细胞后 4.5 h TUNEL 阳性细胞率为 (7.03 ± 1.41)% , 照射后 12 h 为 (34.91 ± 5.96)% , 均明显高于未照射组, 照射后 12 h 组 TUNEL 阳性细胞率明显高于照射后 4.5 h 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) ; 30 mJ/cm² UVB 照射组照射细胞后 4 h TUNEL 阳性细胞率为 (15.76 ± 4.73)% , 照射后 12 h 为 (44.83 ± 2.83)% , 均明显高于未照射组, 照射后 12 h 组 TUNEL 阳性细胞率明显高于照射后 4 h 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ; 50 mJ/cm² UVB 照射组照射细胞后 1 h TUNEL 阳性细胞率为 (7.1 ± 2.54)% , 照射后 6 h 为 (49.3 ± 3.3)% , 均明显高于未照射组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) , (图 5)。

2.4 各组细胞中 Grx2 mRNA 表达量的变化

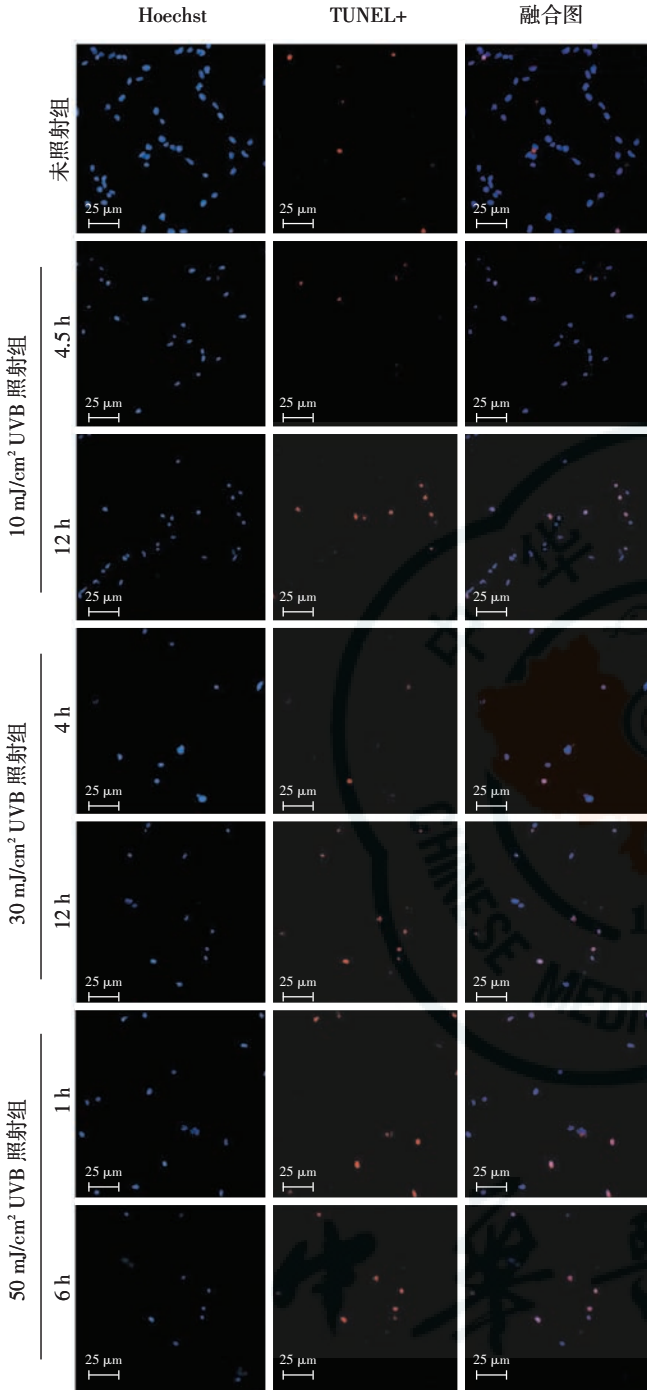


图 4 各组细胞 TUNEL 凋亡检测 (标尺 = 25 μm) 凋亡细胞呈红色荧光 (Cy3), 细胞核呈蓝色荧光 (Hoechst). 未照射组和 10 mJ/cm² UVB 照射组照射后 4.5 h 仅见少量凋亡细胞, 照射后 12 h 凋亡细胞数明显增加. 30 mJ/cm² UVB 照射组照射后 4 h 可见少量凋亡细胞, 照射后 12 h 凋亡细胞明显增多. 50 mJ/cm² UVB 照射组照射后 1 h 和 6 h 即可见较多的凋亡细胞

10 mJ/cm² UVB 照射组和 30 mJ/cm² UVB 照射组照射后 4 h 细胞中 Grx2 mRNA 相对表达量均在该组中达到峰值, 随着照射时间延长 Grx2 mRNA 相对表达量逐渐降低. 50 mJ/cm² UVB 照射组照射后 1 h 达峰值, 其升高速率较 10 mJ/cm² UVB 照射组和 30 mJ/cm²

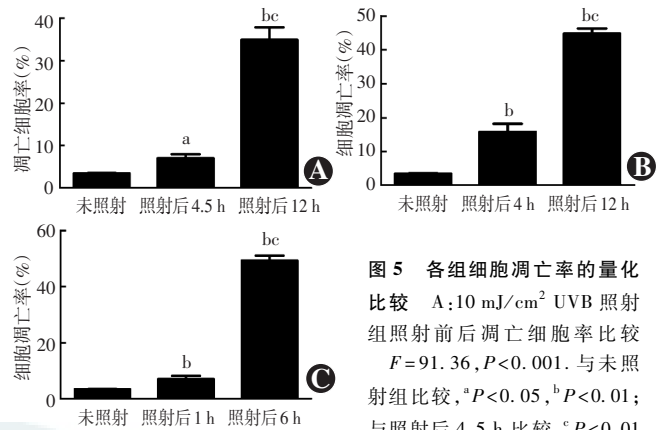


图 5 各组细胞凋亡率的量化比较 A: 10 mJ/cm² UVB 照射组照射前后凋亡细胞率比较 $F=91.36, P<0.001$. 与未照射组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 与照射后 4.5 h 比较, ^c $P<0.01$

(单因素方差分析, SNK-*q* 检验, $n=3$) B: 30 mJ/cm² UVB 照射组照射前后凋亡细胞率比较 $F=167.000, P<0.001$. 与未照射组比较, ^b $P<0.01$; 与照射后 4 h 比较, ^c $P<0.01$ (单因素方差分析, SNK-*q* 检验, $n=3$) C: 50 mJ/cm² UVB 照射组照射前后凋亡细胞率比较 $F=544.600, P<0.001$. 与未照射组比较, ^b $P<0.01$; 与照射后 1 h 比较, ^c $P<0.01$ (单因素方差分析, SNK-*q* 检验, $n=3$)

UVB 照射组更快, 各组在照射前后不同时间点细胞中 Grx2 mRNA 相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}}=48.750, P=0.000; F_{\text{时间}}=2.212, P=0.191$), 其中各组内细胞照射后第 1 次测定的 Grx2 mRNA 相对表达量均明显高于各自组照射前, 且 30 mJ/cm² 和 50 mJ/cm² UVB 照射组照射后第 1 次测定值明显高于 10 mJ/cm² UVB 照射组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 1)。

表 1 各组细胞照射前及照射后 2 次检测的 Grx2 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同次检测的 Grx2 mRNA 表达量		
		照射前	照射后第 1 次	照射后第 2 次
10 mJ/cm ² UVB 照射组*	3	1.01±0.08	2.53±0.48 ^a	0.68±0.29
30 mJ/cm ² UVB 照射组*	3	1.00±0.09	3.53±0.14 ^{bc}	0.23±0.03
50 mJ/cm ² UVB 照射组#	3	1.00±0.07	15.30±3.01 ^{bd}	1.93±0.89

注: $F_{\text{分组}}=48.750, P=0.000; F_{\text{时间}}=2.212, P=0.191$. 与各自组内照射前比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 与照射后第 1 次检测时 10 mJ/cm² UVB 照射组比较, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) * : 第 1 次检测时间为 UVB 照射后 4 h, 第 2 次检测时间为 UVB 照射后 12 h; # : 第 1 次检测时间为 UVB 照射后 1 h, 第 2 次检测时间为 UVB 照射后 6 h

2.5 各组细胞中 Grx2 蛋白的表达变化

10 mJ/cm² UVB 照射组和 30 mJ/cm² UVB 照射组照射后 4 h Grx2 蛋白相对表达量均升高, 照射后 12 h Grx2 蛋白相对表达量均下降, 10 mJ/cm² UVB 照射组照射前后不同时间点 Grx2 蛋白相对表达量总体比较差异无统计学意义 ($F=2.887, P=0.132$), 30 mJ/cm² UVB 照射组照射前后不同时间点 Grx2 蛋白相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F=44.540, P=0.000$), 50 mJ/cm² UVB 照射组照射前后不同时间

点 Grx2 蛋白相对表达量总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 14.490, P = 0.005$)。其中 30 mJ/cm^2 UVB 照射组照射后 4 h 细胞中 Grx2 蛋白相对表达量是未照射组的 1.3 倍, 2 者比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 50 mJ/cm^2 UVB 照射组照射后 1 h Grx2 蛋白相对表达量是未照射组的 1.7 倍, 2 者比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 6)。

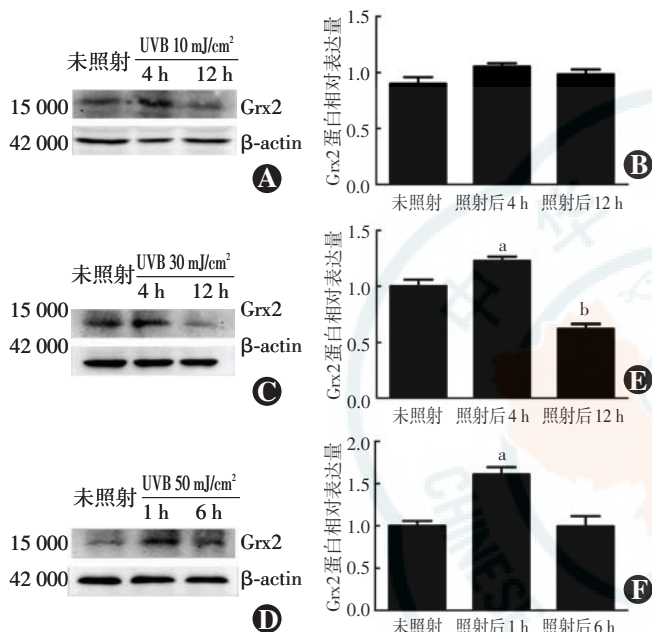


图 6 各组细胞中 Grx2 蛋白表达变化 A: 10 mJ/cm^2 UVB 照射组细胞中 Grx2 蛋白表达电泳图 B: 10 mJ/cm^2 UVB 照射组照射前后细胞中 Grx2 蛋白相对表达量比较 $F = 2.887, P = 0.132$ (单因素方差分析, $n = 3$) C: 30 mJ/cm^2 UVB 照射组细胞中 Grx2 蛋白表达电泳图 D: 30 mJ/cm^2 UVB 照射组细胞中 Grx2 蛋白相对表达量比较 $F = 44.540, P = 0.000$ 。与未照射组比较, $^a P < 0.05, ^b P < 0.01$ (单因素方差分析, SNK- q 检验, $n = 3$) E: 50 mJ/cm^2 UVB 照射组细胞中 Grx2 蛋白表达电泳图 F: 50 mJ/cm^2 UVB 照射组细胞中 Grx2 蛋白相对表达量比较 $F = 14.490, P = 0.005$ 。与未照射组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, SNK- q 检验, $n = 3$)

2.6 不同质粒转染组细胞凋亡情况比较

Grx2 转染组细胞中 Grx2 蛋白表达条带明显强于空质粒组 (图 7), Grx2 转染组和空质粒组 Grx2 蛋白相对表达量分别为 2.06 ± 0.34 和 1.06 ± 0.05 , 组间比较差异有统计学意义 ($t = 5.040, P < 0.05$)。TUNEL 检测显示, 空质粒组和 Grx2 转染组可见少量凋亡细胞, 50 mJ/cm^2 UVB 照射后空质粒组细胞数量减少, 凋亡细胞增多, Grx2 转染组细胞数多于空质粒组, 凋亡细胞较空质粒组减少 (图 8A); 50 mJ/cm^2 UVB 照射组照射后 4 h Grx2 转染组细胞凋亡率为 $(15.34 \pm 1.71)\%$, 明显低于空质粒组的 $(22.11 \pm 2.46)\%$, 差异有统计学意义 ($t = 3.189, P < 0.05$) (图 8B)。

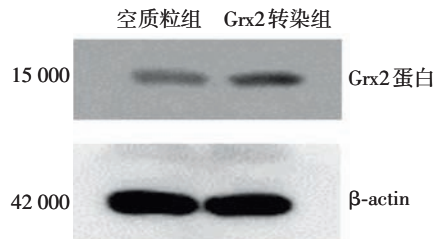


图 7 Western blot 法检测各组中 Grx2 蛋白表达情况 Grx2 转染组细胞中 Grx2 蛋白表达条带明显强于空质粒组

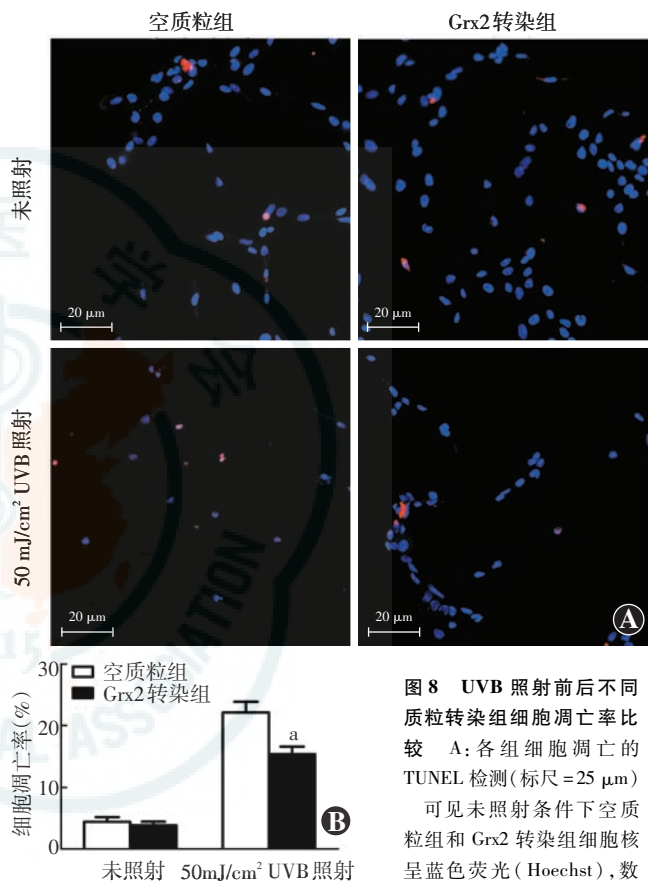


图 8 UVB 照射前后不同质粒转染组细胞凋亡率比较 A: 各组细胞凋亡的 TUNEL 检测 (标尺 = $25 \mu\text{m}$) 可见未照射条件下空质粒组和 Grx2 转染组细胞核呈蓝色荧光 (Hoechst), 数目多, 凋亡细胞呈红色荧光 (Cy3), 50 mJ/cm^2 UVB 照射后空质粒组细胞数量减少, 凋亡细胞增多, Grx2 转染组细胞数多于空质粒组 B: UVB 照射前后不同质粒转染组细胞凋亡率比较 与 50 mJ/cm^2 UVB 照射后空质粒组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) UV: 紫外线

3 讨论

研究表明, 除了先天性白内障以外, LECs 凋亡是各种白内障发生的细胞学基础^[7]。在各种外部或内部有害因素的刺激下, 正常人 LECs 均会发生过度凋亡。实验研究中多采用 H_2O_2 、UVB 照射等方法诱导白内障, 发现晶状体混浊前即存在人 LECs 过度凋亡。

UVB 可以导致细胞损伤, 主要是 DNA 损伤和光化学氧化损伤等^[8], 从而引发细胞凋亡。本研究中发现, 不同剂量 UVB 辐照后细胞存活率下降的速率不同, UVB 辐射剂量越大, 人 LECs 存活率下降速率越快。Shui 等^[9] 研究发现, 用较低能量 UVB 照射后细胞

活力先升高后降低,本研究中观察到 UVB 辐照后细胞存活率的变化有一段平台期,与 Shui 等^[9]的研究一致,提示细胞受到 UVB 辐照后存在一种自我保护机制以对抗损伤作用。

Grx2 属于谷氧还蛋白家族,是体内的氧化还原酶,维持体内的 GSH/GSSG 平衡,维持细胞内氧化还原稳态。在细胞未受到氧化刺激时 Grx2 呈二聚体结构,晶状体结构表明 Grx2 蛋白通过一个硫铁簇形成二聚体,但此结构需要 GSH 来稳定,其中 [2Fe-2S] 可能在细胞内发挥着铁感受器及监视氧化还原状态的作用。在氧化应激状态下,GSH 被氧化为 GSSG,Grx2 二聚体解聚为单体,发挥抗氧化应激作用^[10],Grx2 在人体各组织中广泛表达,在眼部大多数组织中均有表达,包括角膜、虹膜、晶状体、视网膜及视神经^[11]。研究表明,Grx2 可通过保护氧化呼吸链复合体 I 活性阻止 H₂O₂ 引起的 LECs 凋亡^[12]。本研究表明,UVB 照射后人 LECs 中 Grx2 表达水平变化呈先上调后逐渐下降的趋势,可对 UVB 引起的人 LECs 损伤起到缓解作用。其他氧化还原酶也有这种表现,如 Grx1 也属于 Grx 家族,对于 UVB 引起的人 LECs 凋亡氧化损伤有保护作用,研究表明 UVB 照射后小鼠晶状体中 Grx1 也表现为先上升后下降的趋势^[4]。Grx2 是 Grx1 同工酶,H₂O₂ 处理体外培养的人 LECs 可出现细胞中 Grx1 表达出现快速的上调和下调,来修复其他酶和损伤的蛋白^[13]。Toone 等^[14] 研究发现,硫氧还蛋白的编码基因在 H₂O₂ 处理酵母细胞后 20 min 上升 2~3 倍,提示当人 LECs 受到氧化损伤时 Grx2 与 Grx1、硫氧还蛋白等共同抵抗氧化应激反应,保护细胞免受氧自由基损伤。

在不同剂量的 UVB 照射下,Grx2 上调的幅度和速率均不同。研究显示,UVB 照射剂量越大,Grx2 表达上调的速度越快,同时上调的量也越大。但是检测 2 种剂量 UVB 照射后,10 mJ/cm² UVB 照射组 LECs 中 Grx2 mRNA 表达上调了 1.5 倍,30 mJ/cm² UVB 照射组 LECs 中上调了 3.6 倍,表明 10 mJ/cm² UVB 照射组 LECs 中 Grx2 表达量未上升到最大值就开始下降,而细胞凋亡的趋势并未停止,10 mJ/cm² UVB 照射后 24 h 人 LECs 的活力降至 (37.05±4.23)%,30 mJ/cm² UVB 照射后 24 h 人 LECs 细胞活力降至 (24.71±3.31)%。Grx2 主要定位于细胞线粒体中^[15],对于维持线粒体的稳态、保护线粒体功能发挥重要作用^[16],提示细胞受到 UVB 损伤时细胞中 Grx2 的表达受到多种因素的影响,当细胞受到不同程度的损伤时 Grx2 应激反应的程度不同。

综上所述,本研究通过建立 Grx2 过表达细胞模型

对 UVB 诱导的人 LECs 损伤机制进行研究,发现 UVB 照射可导致人 LECs 凋亡,Grx2 与抵抗细胞损伤机制有关。本研究揭示了 UVB 照射后人 LECs 中 Grx2 表达的变化规律,为进一步研究 Grx2 对 UVB 诱导的人 LECs 凋亡的保护机制提供了研究基础,本课题组拟利用 Grx2 基因敲除鼠模型进一步研究 Grx2 的保护机制。

参考文献

- [1] Löfgren S. Solar ultraviolet radiation cataract [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 156: 112–116. DOI:10.1016/j.exer.2016.05.026.
- [2] Lundberg M, Holmgren A, Johansson M. Human glutaredoxin 2 affinity tag for recombinant peptide and protein purification [J]. *Protein Expr Purif*, 2006, 45(1): 37–42. DOI:10.1016/j.pep.2005.07.001.
- [3] Hudemann C, Lönn ME, Godoy JR, et al. Identification, expression pattern, and characterization of mouse glutaredoxin 2 isoforms [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(1): 1–14. DOI:10.1089/ars.2008.2068.
- [4] Zhang J, Yan H, Löfgren S, et al. Ultraviolet radiation-induced cataract in mice: the effect of age and the potential biochemical mechanism [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(11): 7276–7285. DOI:10.1167/jovs.12-10482.
- [5] 严宏,惠延年,姚立农,等.紫外线辐射对 α-晶状体蛋白分子伴侣活性的作用 [J]. *眼科研究*, 2003, 21(2): 125–128. Yan H, Hui YN, Yao LN, et al. Effect of UV irradiation on the molecular chaperone activity of α-crystallin [J]. *Chin Ophthalmol Res*, 2003, 21(2): 125–128.
- [6] 吴欣欣,郭大东,毕宏生,等.紫外线 B 照射对人晶状体上皮细胞膜钙 ATP 酶 3 表达的影响 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(6): 485–491. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.06.002. Wu QX, Guo DD, Bi HS, et al. Effect of ultraviolet B irradiation on the expression of plasma membrane calcium ATPase 3 in human lens epithelial cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(6): 485–491. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.06.002.
- [7] Pendergrass W, Zitnik G, Tsai R, et al. X-ray induced cataract is preceded by LEC loss, and coincident with accumulation of cortical DNA, and ROS; similarities with age-related cataracts [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 1496–1513.
- [8] Yam JC, Kwok AK. Ultraviolet light and ocular diseases [J]. *Int Ophthalmol*, 2014, 34(2): 383–400. DOI:10.1007/s10792-013-9791-x.
- [9] Shui YB, Sasaki H, Pan JH, et al. Morphological observation on cell death and phagocytosis induced by ultraviolet irradiation in a cultured human lens epithelial cell line [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 71(6): 609–618. DOI:10.1006/exer.2000.0917.
- [10] Mitra S, Elliott SJ. Oxidative disassembly of the [2Fe-2S] cluster of human Grx2 and redox regulation in the mitochondria [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(18): 3813–3815. DOI:10.1021/bi900112m.
- [11] Upadhyaya B, Tian X, Wu H, et al. Expression and distribution of thiol-regulating enzyme glutaredoxin 2 (GRX2) in porcine ocular tissues [J]. *Exp Eye Res*, 2015, 130: 58–65. DOI:10.1016/j.exer.2014.12.004.
- [12] 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.
- [13] Raghavachari N, Krysan K, Xing K, et al. Regulation of thioltransferase expression in human lens epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(5): 1002–1008.
- [14] Toone WM, Kuge S, Samuels M, et al. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spcl [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(10): 1453–1463.
- [15] Johansson C, Kavanagh KL, Gileadi O, et al. Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(5): 3077–3082. DOI:10.1074/jbc.M608179200.
- [16] Karunakaran S, Saeed U, Ramakrishnan S, et al. Constitutive expression and functional characterization of mitochondrial glutaredoxin (Grx2) in mouse and human brain [J]. *Brain Res*, 2007, 1185: 8–17. DOI:10.1016/j.brainres.2007.09.019.

(收稿日期:2017-12-16 修回日期:2018-01-16)

(本文编辑:尹卫靖)