

# 莱菔硫烷激发的细胞自噬潮对离体人晶状体囊上细胞增生的抑制作用

刘含若 袁博伟 安莹 万修华

100005 北京,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科研究所 北京市眼科学与视觉科学重点实验室

通信作者:万修华,Email:xiuhuawan@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.03.009

**【摘要】背景** 研究已证实莱菔硫烷(SFN)为一种有效的化学预防剂,能调控生物体不同的分子机制以抑制细胞的无序生长。自噬是人体细胞维持自身内环境的生物过程,探讨 SFN 对晶状体上皮细胞(LECs)生物学行为的影响及其与细胞自噬的关系有助于为后发性白内障(PCO)的预防和靶向治疗提供新的思路。

**目的** 探讨 SFN 诱导人 LECs 凋亡的直接作用及其激发细胞自噬潮的作用机制。**方法** 将离体 24 h 内的人供体眼行常规白内障超声乳化手术,取出的完整晶状体囊袋置于含体积分数 2% 胎牛血清的 EMEM 中培养,建立 PCO 囊袋模型。按照组别分别于培养基中添加 0(空白对照组)、1、10 和 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 培养 30 d,观察各组晶状体囊袋上细胞的生长情况,并采用免疫荧光技术检测细胞中 F-actin 和 Vimentin 的表达。用含 5% 胎牛血清的 EMEM 培养晶状体上皮细胞系 FHL124,将培养的细胞分为空白对照组 1、10、30 和 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 处理组,行乳酸脱氢酶(LDH)释放试验以测定各组细胞 LDH 释放的百分率;采用划痕试验检测各组细胞划痕面积的变化以评估细胞迁移能力;透射电子显微镜下观察各组细胞中自噬囊泡的超微结构及数量;采用 Western blot 法检测 SFN 组、SFN+3-MA 组和 3-MA 处理的细胞自噬活动特异蛋白 LC3 的相对表达。**结果** 各不同质量浓度 SFN 组晶状体囊袋上细胞覆盖率总体比较差异有统计学意义( $F=48.57, P<0.01$ )。10  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组明显低于空白对照组和 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组。免疫荧光检测技术表明空白对照组增生细胞中 F-actin 和 Vimentin 染色阳性,增生的细胞排列致密,随着 SFN 质量浓度升高,F-actin 和 Vimentin 阳性细胞密度下降,100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组未发现 F-actin 和 Vimentin 阳性细胞。空白对照组及 1、10、30 和 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组细胞 LDH 释放量(A 值)分别为 0.19 $\pm$ 0.03、0.39 $\pm$ 0.06、0.56 $\pm$ 0.07、0.68 $\pm$ 0.08 和 0.89 $\pm$ 0.09,其中 10、30、100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组细胞 LDH 释放量均明显高于空白对照组,随着 SFN 质量浓度升高,细胞 LDH 释放量逐渐增加,均明显高于其相邻的低质量浓度组,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )。随着 SFN 质量浓度的升高,划痕面积减少率呈下降趋势,10、30、100  $\mu\text{mol/L}$  随着 SFN 质量浓度升高,划痕面积的减少均明显低于其相邻的低质量浓度组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。空白对照组、SFN 组、SFN+3-MA 组和 3-MA 细胞中 LC3-II 蛋白表达的灰度值分别为 0.423 $\pm$ 0.003、14.543 $\pm$ 0.024、0.668 $\pm$ 0.024 和 0.576 $\pm$ 0.056,SFN+3-MA 和 3-MA 组 LC3-II 蛋白表达的灰度值均明显低于 SFN 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )。空白对照组及 1、10 和 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组间自噬小体数量分别为 4.07 $\pm$ 0.32、4.13 $\pm$ 0.34、9.21 $\pm$ 0.53 和 21.02 $\pm$ 1.34,其中 10 和 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组细胞中自噬小体数量均明显高于空白对照组及 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )。**结论** SFN 可以激发人 LECs 自噬潮,从而抑制离体人晶状体囊上 LECs 的增生,促进 LECs 的死亡。本研究结果有望成为预防和治理 PCO 的新药。

**【关键词】** 晶状体囊; 异硫氰酸; 硫氰酸类/治疗作用; 细胞系; 晶状体上皮细胞; 生物模型; 自噬/药物作用; 后发性白内障

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(30471861); 国务院妇女儿童工作委员会课题(2014108); 北京市科技新星项目(H020821380190)

## Inhibition effects of sulforaphane-induced autophagy flux to cell proliferation on *ex vivo* human capsular bags

Liu Hanruo, Yuan Bowei, An Ying, Wan Xiuhua

Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital of Capital Medical University, Beijing Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Sciences, Beijing 100005, China

Corresponding author: Wan Xiuhua, Email: xiuhuawan@163.com

**【Abstract】Background** Sulforaphane (SFN) is an effective chemopreventive agent and can regulate the biological molecular mechanisms to inhibit the overgrowth of cells. Autophagy is a biological process of maintaining cellular internal environment. Understanding the affection of SFN to biological behavior of human lens epithelial cells

(LECs) and the association of SFN with autophagy is helpful for the prevention and target treatment of posterior capsule opacification (PCO). **Objective** This study was to investigate the eradication effects of SFN on residual lens cell population *in vitro* posterior capsule opacification (PCO) model and evaluate the mechanism of SFN-induced cell death. **Methods** *In vitro* human capsular bag models were generated from fresh donor eyes by phacoemulsification and were cultured in EMEM containing 2% fetal bovine serum (FBS). Different concentrations of SFN (0, 1, 10 and 100  $\mu\text{mol}$ ) were added in the medium for 30 days respectively according to grouping, and the growth of LECs was observed by optical microscope and immunofluorescence technique. FHL124, a human LEC line, was cultured with EMEM containing 5% FBS and divided into 0, 1, 10, 30 and 100  $\mu\text{mol}$  SFN groups. Lactate dehydrogenase (LDH) release rate in the medium was detected to evaluate cell damage/death. The migration of the cells on capsular bags was assessed by scratch test. The ultrastructure and number of autophagosomes were examined under the transmission electron microscope. The expression of LC3 in the cells were detected using Western blot in the presence or absence of autophagy inhibitors. **Results** The cell coverage rates on the capsular bags were significantly lower in the 10 and 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN groups than those in the 0 and 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN groups, with a statistically significant difference among the groups ( $F = 48.57, P < 0.01$ ). Immunofluorescence showed that the density of F-actin and Vimentin-positive cells was evidently decreased in the 10 and 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN groups compared with 0 and 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN groups. The releasing levels of LDH (absorbance) were  $0.19 \pm 0.03, 0.39 \pm 0.06, 0.56 \pm 0.07, 0.68 \pm 0.08$  and  $0.89 \pm 0.09$  in the 0, 1, 10, 30 and 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN groups, respectively, and the releasing level of LDH was gradually increased in the 10 and 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN groups in comparison with the 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN group (all at  $P < 0.01$ ). With the increase of SFN concentration, the reduction rate of scratched area decreased with the increase of SFN concentration, and the decrease of scratch area was significantly lower than that of adjacent low mass concentration group and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The relative expressions of LC3-II protein were  $0.423 \pm 0.003, 14.543 \pm 0.024, 0.668 \pm 0.024$  and  $0.576 \pm 0.056$  in the blank control group, SFN group, SFN + 3-MA group and 3-MA group, respectively, and the relative expressions of LC3-II protein were significantly lower in the SFN + 3-MA group and 3-MA group than those in the SFN group (all at  $P < 0.01$ ). The number of autophagosomes was  $4.07 \pm 0.32, 4.13 \pm 0.34, 9.21 \pm 0.53$  and  $21.02 \pm 1.34$  in the blank control group, and 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN groups, and the number of autophagosomes in the 10 and 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN groups was significantly higher than that in the blank control group and 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN group (all at  $P < 0.01$ ). **Conclusions** SFN mediates LECs death by promoting autophagy in *ex vivo* capsular bags, and SFN may be a novel agent of potential chemopreventive and target treatment for PCO.

**[Key words]** Lens capsule, crystalline; Isothiocyanates; Thiocyanates/therapeutic use; Cell line; Lens epithelial cells; Models, biological; Autophagy/drug effects; Posterior capsule opacification

**Fund program:** National Natural Science Fund Projects of China (30471861); Fund of Work Committee for Women and Children of China State Department (2014108); Beijing New Star of Science and Technology (H020821380190)

后发性白内障 (posterior capsule opacification, PCO) 是白内障术后常见的并发症,也是导致患者视力再次下降的主要原因。PCO 的发生与内囊袋中残留晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 在后囊膜上的增生、迁移和转分化并分泌胶原和基底膜养物质有关<sup>[1]</sup>,因此理论上讲防止 PCO 的有效方式是在白内障摘出手术中尽量消除晶状体内囊袋的细胞或抑制残留在前囊上的 LECs 的增生和迁移。以往的关于应用细胞毒性药物抑制人或动物 LECs 生物学行为的研究均处于临床前研究阶段,这些药物包括丝裂霉素、5-氟尿嘧啶和毒胡萝卜素<sup>[2-4]</sup>,其临床疗效尚不清楚。寻求安全有效的且可以阻止 PCO 发生的治疗药物或疗法一直是近年来眼科研究的热点之一。研究表明莱菔硫烷 (sulforaphane, SFN),具有诱导 Keap1 及 Nrf2 结合,通过泛素化途径降解 Nrf2,诱导内源性抗氧化酶系的合成,从而发挥抗氧化作用并促使肿瘤细胞分裂周期停滞和细胞凋亡<sup>[5-12]</sup>。此外,近年来关于细胞的生

物学行为研究也聚焦于细胞的自噬方面。自噬是细胞降解和回收细胞内受损老化细胞器、长寿蛋白、错误折叠蛋白聚集物以维持细胞物质、能量代谢及内环境稳定的一种高度保守的生物学过程<sup>[13]</sup>,但自噬与 LECs 代谢的关系以及 SFN 的抑制细胞代谢作用与细胞自噬间有无关联尚不明了。本研究拟观察 SFN 诱导的体外 LECs 凋亡及其激发细胞自噬潮的作用机制,为寻找新型抗 PCO 药物提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

23 ~ 28 代人晶状体上皮细胞系 FHL124 (英国东安格利亚大学馈赠) 细胞。SFN、四甲基偶氮唑盐、抗 LC3I/LC3 II 一抗 (编号 L8918, 1 : 500) (美国 Sigma 公司)、二抗 (编号 554020, 1 : 4 000) (英国 Amersham Biosciences 公司); Eagle's 最低基础培养液 (Eagle's minimum essential medium, EMEM)、胎牛血清 (美国

Hyclone 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 PCO 囊袋模型的建立** 人离体 24 h 内的供体眼行常规方法行白内障超声乳化手术,环形撕囊并吸除晶状体核和皮质后,将医用硅胶制成的密闭囊袋冲洗系统折叠后送入前房,在前房内展开后覆盖在晶状体环形撕囊口外。密闭囊袋冲洗系统是由一个帽型的罩和与之相连的注入和吸除通道所构成,操作时将罩对准环形撕囊口处注入,在通道关闭的情况下通过抽吸吸出通道产生负压,使罩密闭在囊膜上。然后注入少量锥虫蓝,若前房内未渗入锥虫蓝说明密闭好。吸出锥虫蓝,用平衡盐溶液冲洗。术后完整取出囊袋,置于含体积分数 2% 胎牛血清的 EMEM 中培养 4 周,相差显微镜下进行拍照。每组实验重复 3 次。

**1.2.2 乳酸脱氢酶释放试验** 观察各组细胞的损伤情况 将 FHL124 细胞接种于 48 孔板,用含 5% 胎牛血清的 EMEM 培养基进行培养,细胞贴壁后更换为无血清培养基,继续培养 24 h。将培养细胞分为不同质量浓度 SFN(1、10、30、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 组和空白对照组,分别于培养液中注入 1、10、30、100  $\mu\text{mol/L}$  SFN,24 h 后吸除 SFN,空白对照组培养基中不添加 SFN。各组细胞设 4 次独立实验,每次 2 个平行孔,用培养液冲洗 3 遍,用含 5% 胎牛血清的 EMEM 培养基继续培养 72 h,然后按照乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒的步骤进行试验,采用板式荧光分析仪于激发光波长 560 nm 和发射光波长 590 nm 处测定 LDH 释放的百分率。 $\text{LDH 漏出率}(\%) = \frac{\text{实验组 LDH 质量浓度}}{\text{细胞 LDH 最大释放量}} \times 100\%$ 。每组设 3 个复孔,重复测量 3 次。

**1.2.3 划痕试验** 检测各组细胞的迁移 用培养皿常规转染 FHL124 细胞 12 h,用 200  $\mu\text{l}$  微量移液头在 6 孔板内垂直划痕,PBS 液冲洗 2 次,加入无血清培养基。分别将 1、10、30 或 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 加入培养液,空白对照组不添加 SFN。各组细胞 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 24 h,用 PBS 冲洗 3 次,用无血清培养基继续培养 72 h,相差显微镜下观察细胞迁移情况。利用 imageJ 分析软件(在 <http://rsbweb.nih.gov/ij/> 在公共平台下载)对图片进行分析,然后测量原始划痕区面积和经过 24 h 培养后划痕区域面积。 $\text{划痕面积减少率} = \frac{24 \text{ h 培养后划痕区域面积}}{\text{原始划痕区面积}} \times 100\%$ 。

**1.2.4 免疫荧光检测法** 观察各组细胞中 F-actin 阳性细胞的表现 将不同质量浓度 SFN(1、10、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 组和空白对照组培养的囊袋,用质量分数 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 漂洗 5 min/次,共 3 次,用体积分数

0.5% Triton X-100 破膜 15 min,PBS 漂洗 5 min/次,共 3 次,质量分数 3% 胎牛血清室温封闭 1 h,加入兔抗鼠 F-actin 一抗(1:500)。4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,PBS 漂洗 5 min/次,共 3 次,加入羊抗兔 Vimentin 抗体(1:300)室温孵育 1 h,PBS 漂洗 5 min/次,共 3 次,Chromatin(1:1000)染色 10 min,PBS 漂洗 5 min/次,共 3 次,甘油封片,荧光显微镜下观察并拍照。任意选取 5 个视野,计算平均 F-actin 阳性细胞比例。囊袋上细胞 F-actin 表达阳性,呈红色荧光,Vimentin 阳性表达呈绿色荧光,细胞核呈蓝色荧光(Chromatin)。

**1.2.5 透射电子显微镜下观察细胞中自噬活动** 用胰蛋白酶消化细胞并离心,PBS 清洗 2 遍,2.5% 戊二醛(0.1 mol/L PBS, pH 7.4)固定细胞 30 min,质量分数 1%  $\text{O}_5\text{O}_4$ (0.1 mol/L PBS, pH 7.2)4  $^{\circ}\text{C}$  继续固定 2 h,乙醇梯度脱水,将固定好的细胞切片,厚度为 60 nm,用醋酸铀-柠檬酸铅复染,JEM1230 透射电子显微镜下观察。

**1.2.6 Western blot 法检测** 各组细胞中自噬体膜相关蛋白微管相关蛋白 1 的轻链 3 的表达 将正常传代培养的 FHL124 细胞分为空白对照组、SFN 组、SFN+3-MA 组和 3-MA 组。按分组加入 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 中处理 24 h 后,为进一步检验 SFN 是否激发了细胞内自噬活动,将早期自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA)加入到细胞,再培养 6 h。用 Western blot 检测特异的自噬体膜相关蛋白微管相关蛋白 1 的轻链 3(light chain 3 of microtubule associated protein 1, LC3)的水平。收集细胞,加入细胞裂解液,4  $^{\circ}\text{C}$ ,离心半径 8 cm,12 000 r/min,离心 5 min,收集上清液,蛋白质样品于等体积的 2 倍十二烷基硫酸钠加样缓冲液混匀,煮沸 5 min,紫外分光光度法测定蛋白质浓度。按蛋白质含量测定结果每孔上样量为 20  $\mu\text{g}$ ,质量分数 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品。用 0.8 mA/ $\text{cm}^2$  电转移 2 h,将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上,用封闭液室温封闭 2 h,将膜与溶于封闭液中的一抗(1:2000)共同在室温下孵育 2 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min,TBS 洗 3 次,每次 5 min,将膜与溶于封闭液中的二抗(1:1000)共同在室温下孵育 2 h,TBS 洗 3 次,每次 7 min,双蒸馏水清洗 2 次,加入超强 DAB 显色,蒸馏水冲洗,中止显色,摄片。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件分析系统(IBM SPSS Statistics, USA)对数据进行处理。本研究中测试指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,组间数据经 Levene 检验方差齐,以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素干预多水平分组的研究设计,空白对照组及不同质量浓

度 SFN 组间细胞覆盖率、LDH 释放量、细胞迁移能力、划痕面积减少率和自噬囊泡数量的总体差异比较采用单因素方差分析;空白对照组、SFN 组、SFN+3-MA 组和 3-MA 组间细胞中 LC3-II 蛋白相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析;组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组 FHL124 细胞的增生情况

供体眼取出的囊袋培养后 8 d 在后囊中央可见细胞生长。空白对照组可见晶状体囊袋上有较多细胞生长,1  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组囊袋上生长的细胞数与空白对照组接近(图 1A、B),10  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组晶状体后囊中央可见细胞生长,但细胞数量少,体积小(图 1C),100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组晶状体后囊中央未发现细胞生长,前囊上细胞也出现数量稀少的情况(图 1D)。空白对

照组晶状体囊袋上细胞覆盖率设为  $100.00 \pm 0.00$ ,1  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组、10  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组和 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组细胞覆盖率分别为  $(95.00 \pm 1.97)\%$ 、 $(48.00 \pm 1.38)\%$  和  $(0.00 \pm 5.22)\%$ ,各组间细胞覆盖率总体比较差异有统计学意义( $F = 48.57, P < 0.01$ ),其中 10  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组晶状体囊袋上细胞覆盖率明显低于空白对照组和 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 1E)。晶状体囊袋培养第 30 天,空白对照组增生的细胞完全覆盖后囊袋,1  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组晶状体后囊上覆盖的细胞与空白对照组接近,10  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组的囊袋细胞密度明显减少,100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组后囊膜上无细胞生长(图 2)。

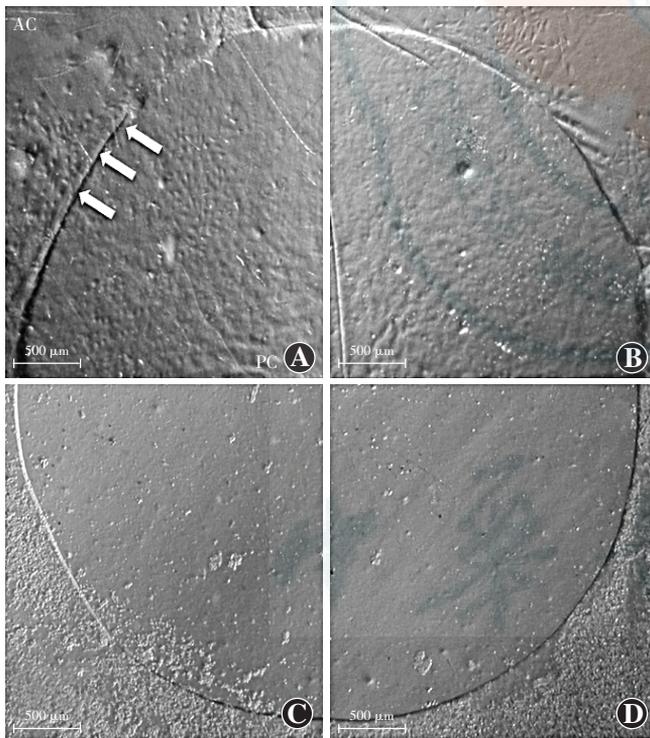


图 1 晶状体囊袋培养后 30 d 细胞生长情况(标尺 = 500  $\mu\text{m}$ )

A: 空白对照组晶状体后囊、撕囊口(箭头)和囊外均长满细胞  
B: 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组可见晶状体囊袋中长满细胞,与图 A 中表现

近似 C: 10  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组晶状体囊袋中生长的细胞密度小 D: 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组囊袋中无细胞生长 E: 各组晶状体囊袋中细胞覆盖率定量比较  $F = 48.57, P < 0.01$ 。与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 10  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 3$ ) PC: 晶状体后囊; AC: 晶状体囊外; SFN: 莱菔硫烷

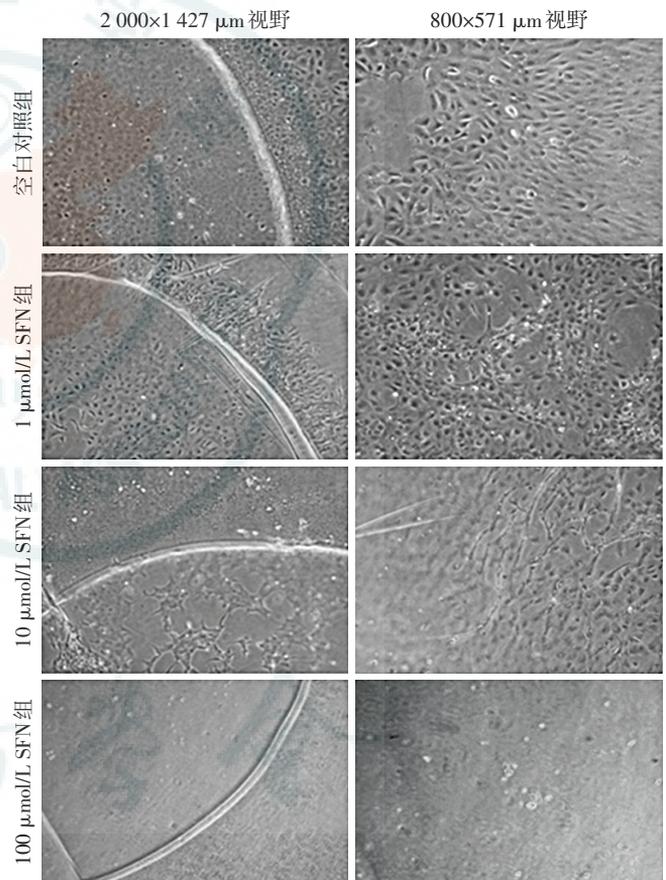


图 2 倒置显微镜下各组晶状体囊袋培养 30 d 细胞生长情况 空白对照组生长的细胞铺满囊袋,1  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组囊袋上生长的细胞较多,10  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组囊袋上生长的细胞较少,100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组囊袋上无细胞生长 SFN: 莱菔硫烷

### 2.2 各组细胞生长情况的免疫荧光检测结果

空白对照组及 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN 细胞细胞形态一致,相互交错,大小一致,细胞质中呈绿色荧光,F-actin 阳性细胞达 95% 以上。10  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组相较于空白对照组及 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组细胞数显著减少,而 100  $\mu\text{mol/L}$  SFN 组细胞稀少几乎不可见。

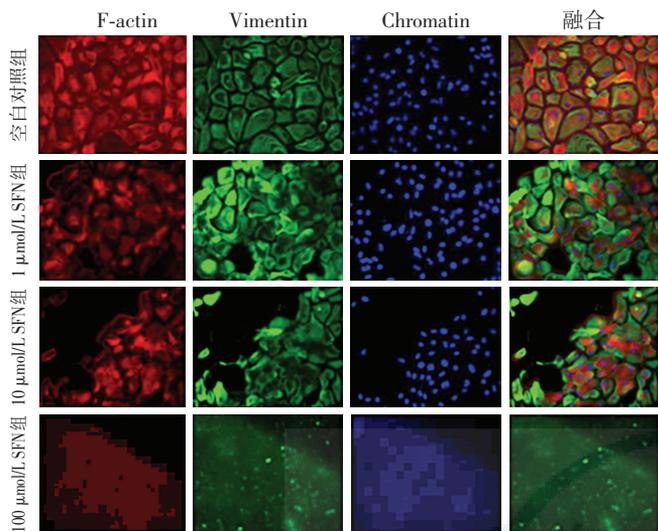


图3 各组细胞的免疫荧光检测结果 囊袋培养 24 h, 空白对照组可见囊袋上细胞 F-actin 表达阳性, 呈红色荧光, Vimentin 阳性表达呈绿色荧光, 细胞核呈蓝色荧光 (Chromatin)。448 μm×342 μm 视野范围下空白对照组细胞完全覆盖晶状体囊, 1 μmol/L SFN 组可见细胞囊上有局灶性细胞缺失, 10 μmol/L SFN 组可见片状细胞缺失, 100 μmol/L SFN 组可见晶状体囊上无细胞生长 SFN: 莱菔硫烷

### 2.3 各组细胞 LDH 释放量的比较

用 LDH 法测定, 随着 SFN 浓度的升高, FHL124 细胞的死亡率呈上升趋势, 空白对照组及 1、10、30 和 100 μmol/L SFN 组细胞 LDH 释放量 (A 值) 分别为 0.19±0.03、0.39±0.06、0.56±0.07、0.68±0.08 和 0.89±0.09, 组间总体比较差异有统计学意义 ( $F = 87.56, P < 0.01$ ), 其中 10、30、100 μmol/L SFN 组细胞的 LDH 释放量均明显高于空白对照组, 随着 SFN 质量浓度升高, 细胞的 LDH 释放量逐渐增加, 均明显高于其相邻的低质量浓度组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 4)。

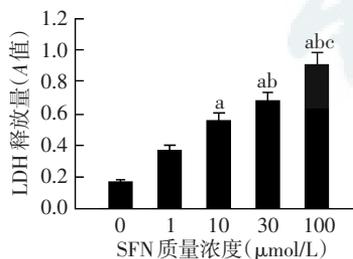


图4 各组细胞 LDH 释放量的比较  $F = 64.83, P < 0.01$ . 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 1 μmol/L SFN 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 10 μmol/L SFN 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 3$ ) LDH: 乳酸脱氢酶; SFN: 莱菔硫烷

### 2.4 各组细胞迁移能力和划痕面积减少率的比较

各组细胞培养皿划痕后 24 h 可见划线的边缘整齐锐利, 划痕后 48 h 可见细胞向内生长, 划线边缘不整齐, 划痕后 72 h 空白对照组和各质量浓度 SFN 组在划痕两侧的细胞向划痕内迁移, 与空白对照组和 1 μmol/L SFN 组比较, 10 μmol/L、30 μmol/L 及 100 μmol/L SFN 处理组划痕后 72 h 迁移细胞数极少

(图 5A, B)。空白对照组及 1、10、30 和 100 μmol/L SFN 组划痕面积减少率分别为  $(88.34 \pm 8.01)\%$ 、 $(80.52 \pm 7.32)\%$ 、 $(10.87 \pm 2.44)\%$ 、 $(4.38 \pm 1.25)\%$  和  $(1.23 \pm 0.4)\%$ , 组间总体比较差异有统计学意义 ( $F = 97.86, P < 0.01$ ), 其中 10、30、100 μmol/L SFN 组的划痕面积减少率均明显低于空白对照组, 随着 SFN 质量浓度升高, 划痕面积减少率均明显低于其相邻的低质量浓度组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 5C)。

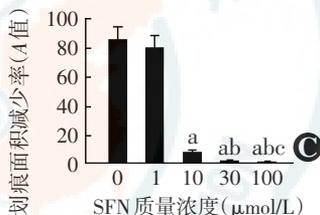
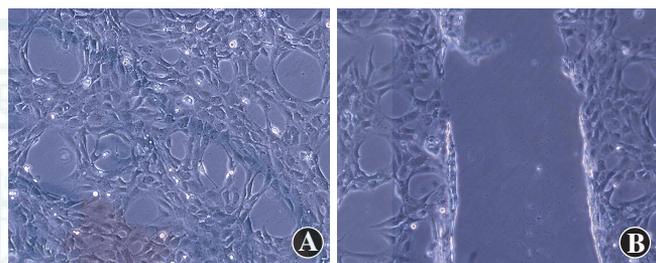


图5 各组培养皿划痕后 72 h 细胞迁移情况 A: 空白对照组可见划痕两侧迁移细胞较多 ( $\times 200$ ) B: 100 μmol/L SFN 组划痕线内细胞极少 ( $\times 200$ ) C: 各组划痕面积减少率量化比较  $F = 97.86, P < 0.01$ . 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 10 μmol/L SFN 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 30 μmol/L SFN 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 3$ ) SFN: 莱菔硫烷

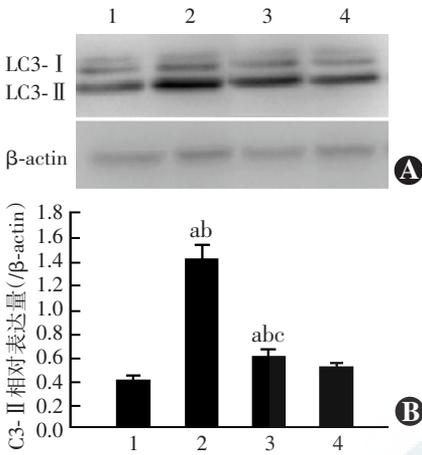
### 2.5 各组细胞中 LC3-II 蛋白表达

Western blot 检测结果表明, 空白对照组、SFN 组、SFN+3-MA 组和 3-MA 组中细胞中 LC3-II 蛋白表达的灰度值分别为  $0.423 \pm 0.003$ 、 $14.543 \pm 0.024$ 、 $0.668 \pm 0.024$  和  $0.576 \pm 0.056$ , 组间总体比较差异有统计学意义 ( $F = 982.012, P = 0.000$ ); 其中 SFN 组 LC3-II 蛋白表达的灰度值明显高于空白对照组, SFN+3-MA 和 3-MA 组 LC3-II 蛋白表达的灰度值均明显低于 SFN 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 6)。

### 2.6 各组细胞中自噬囊泡的超微结构及数量

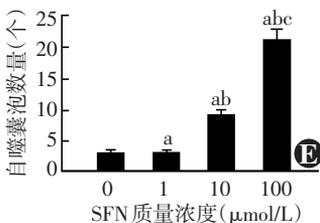
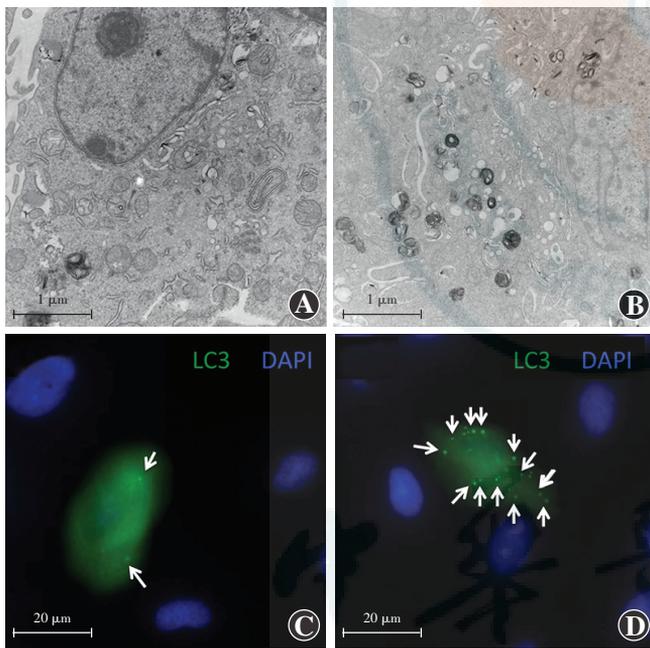
透射电子显微镜下 SFN 组和 SFN+3-MA 组细胞的胞质中可见多膜的空泡样结构, 其中含有较多残余消化物质的自噬体和自噬前体, 而空白对照组中自噬小体数量明显减少。荧光显微镜下可见自噬囊泡中 LC3 表达呈绿色荧光 (图 6A)。空白对照组及 1、10 和 100 μmol/L SFN 组自噬小体数量分别为  $(4.07 \pm 0.32)$ 、 $(4.13 \pm 0.34)$ 、 $(9.21 \pm 0.53)$  和  $(21.02 \pm 1.34)$  个, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 87.56, P < 0.01$ ), 其中 10 和 100 μmol/L SFN 组细胞中自噬小体数量均

明显高于空白对照组及 1 μmol/L SFN 组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(图 7)。



**图 6 Western blot 法检测各组细胞中 LC3 蛋白表达** A: 各组细胞中 LC3 蛋白表达的电泳图显示 SFN 组细胞中 LC3-II 蛋白表达条带最强 B: 各组细胞中 LC3-II 相对表达量的量化比较  $F = 982.012$ ,  $P < 0.01$ . 与空白对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与 SFN 组比较,  $^b P < 0.01$ ; 与 3-MA 组比较,  $^c P < 0.01$ (单因素

方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) 1: 空白对照组 2: SFN 组 3: SFN + 3-MA 组 4: 3-MA 组 SFN: 莱菔硫烷; MA: 甲基腺嘌呤; LC: 微管相关蛋白 1 的轻链



**图 7 透射电子显微镜下和荧光显微镜下各组细胞自噬囊泡结构和数量** A: 空白对照组细胞中有少量含有少量残余消化物质的囊泡(标尺=1 μm) B: SFN 组细胞中可见含有大量残余消化物质的自噬体和自噬前体, 呈多膜的空泡样结构(标尺=1 μm) C: 荧光显微镜下可见空白对照组囊泡呈绿色荧光, 内含少量消化物质(箭头)(×500) D: 荧光显微镜下可见 SFN 组囊泡呈绿色荧光, 内含大量消化物质(箭头)(×500) E: 各组细胞中自噬囊泡数量的量化比较  $F = 87.56$ ,  $P < 0.01$ . 与空白对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与 1 μmol/L SFN 组比较,  $^b P < 0.01$ ; 与 10 μmol/L SFN 组比较,  $^c P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) SFN: 莱菔硫烷

### 3 讨论

近年来对 SFN 的研究主要集中于对肿瘤的治疗方面, SFN 可以通过激发 ERK 通路发挥上调神经细胞内自噬活动<sup>[14]</sup>, 其与眼科疾病间关系的研究报告尚不多见。本研究为首次利用人晶状体囊袋培养法来评估 SFN 对人 LECs 生物学行为的影响, 发现 SFN 对人 LECs 的增生和迁移均有明显的抑制作用, 其作用呈剂量依赖性, 10 μmol/L SFN 作用于离体人晶状体后囊膜上细胞的增生数量减少, 100 μmol/L SFN 作用后晶状体后囊上无细胞增生。为进一步观察 SFN 对 LECs 的毒性作用, 本研究中采用 LDH 试验来判断细胞死亡率, 发现 SFN 的细胞毒性作用呈剂量依赖性, 10 μmol/L SFN 作用后细胞致死率可达 56%, 100 μmol/L SFN 则可高达 96%。此外本研究中还利用划痕试验模型评估 SFN 对 FHL124 细胞迁移和增生的影响, 发现 10 和 100 μmol/L SFN 作用后晶状体囊袋上细胞密度减少, 这进一步证实了我们的假设, 即高剂量 SFN 可以启动某种形式的细胞死亡。

细胞的自噬功能在维持细胞物质和能量代谢及内环境的稳定方面发挥重要作用, 这个过程在细胞内持续存在, 但水平较低, 并可参与机体的多种生理及病理过程, 如发育、免疫及老化等。自噬与多种疾病的发生有密切的联系, 如肿瘤、神经退行性疾病、糖尿病、感染等。细胞处于应激状态时, 如在细胞外界环境缺少营养能量、氧气或细胞器、DNA 损伤等条件下, 细胞的自噬水平即快速升高, 以维持细胞物质及能量代谢的稳定, 产生自噬潮, 眼睛的所有类型的细胞也存在一种或多种自噬途径, 以维持细胞正常的生理结构和功能的稳定。Costello 等<sup>[15]</sup>通过激光扫描共焦显微镜观察处于胚胎和成熟期的晶状体细胞, 发现分化过程中的纤维细胞及上皮细胞中均存在典型的双层膜结构自噬泡, 其中含有变形、肿胀、破碎的线粒体, 证明晶状体细胞中存在自噬机制。自噬及微自噬可消化或清除晶状体细胞内细胞器的退化物质。Brennan 等<sup>[16]</sup>发现晶状体中表达 40 余种自噬相关基因, 其中不仅包括巨自噬全部通路的部分相关基因, 同时也包含线粒体自噬及分子伴侣介导自噬的相关基因, 不同的自噬基因表达和分布于不同的晶状体细胞中, 提示晶状体上皮细胞和纤维细胞中的自噬水平不同, 这一现象与不同晶状体细胞的生理功能密切相关。利用血清饥饿的方法诱导 LECs 内自噬及线粒体自噬标记物的聚集可以证明 LECs 在环境压力的诱导下促进自噬的产生。LC3 定位于前自噬泡和自噬泡膜表面, 参与自噬体的形成, 是

自噬最常用的标志物<sup>[17]</sup>。自噬发生时胞质型 LC3(即 LC3-I)会酶解掉一小段多肽,经泛素样加工修饰转变为自噬体膜型 LC3(即 LC3-II)。LC3-II 结合并始终位于细胞自噬体的膜上,其含量与自噬囊泡的数量成正比。因此,LC3-II/I 比值变化可评估自噬水平。3-MA 是 PI3K 的抑制剂,可特异性阻断细胞自噬过程中自噬泡与溶酶体的融合,是细胞自噬抑制剂。本研究中采用免疫组织化学法从蛋白水平证实了 SFN 对 LECs 中自噬潮的激发作用,发现 SFN 作用后细胞中自噬特异蛋白 LC3-II/I 的表达是对照组的 3.5 倍,透射电子显微镜下发现细胞中自噬小体的数量明显增多。就我们所知,关于自噬在 PCO 方面的研究仅有少数报道<sup>[18-19]</sup>,但尚未涉及到具体的信号通路。研究已证实 SFN 是一些细胞自噬的诱导剂,但目前还不清楚其诱导自噬潮与抑制细胞迁移的关系。本研究中我们首次揭示了 SFN 对 LECs 生物学行为的影响,并发现 SFN 可使人 LECs 自噬增强,从而延缓 PCO 的发生。值得注意的是,Chandler 等<sup>[22]</sup>发现 CsA 可诱导自噬的发生,进而导致 LECs 死亡,但 CsA 几乎不能诱导细胞凋亡。因此继续探索自噬与凋亡之间的关系及 SFN 抑制 LECs 生长的作用仍是研究的热点,有助于深入了解自噬过程在晶状体相关疾病中的作用和意义。

本研究中通过观察 SFN 对囊袋内细胞形态和生长状态的影响,探讨了其对 PCO 可能的抑制作用,此外本研究进一步证实了 SFN 的细胞毒性作用及其对细胞的迁移和生长的抑制作用,从蛋白水平和超微结构角度验证了其中可能涉及的自噬活动,进一步研究相关过程的信号通路对阐明晶状体疾病的发病机制及其相关眼病的靶向治疗具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Mootha VV, Tesser R, Qualls C. Incidence of and risk factors for residual posterior capsule opacification after cataract surgery [J]. J Cataract Refract Surg, 2004, 30(11): 2354-2358. DOI: 10.1016/j.jcrs.2004.03.038.
- [2] Jordan JF, Kociok N, Grisanti S, et al. Specific features of apoptosis in human lens epithelial cells induced by mitomycin C *in vitro* [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2001, 239(8): 613-618.
- [3] Fernandez V, Fragoso MA, Billotte C, et al. Efficacy of various drugs in the prevention of posterior capsule opacification; experimental study of rabbit eyes [J]. J Cataract Refract Surg, 2004, 30(12): 2598-2605. DOI: 10.1016/j.jcrs.2004.05.013.
- [4] Duncan G, Wormstone IM, Liu CS, et al. Thapsigargin-coated intraocular lenses inhibit human lens cell growth [J]. Nat Med, 1997, 3(9): 1026-1028.
- [5] Juge N, Mithen RF, Traka M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane; a comprehensive review [J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(9): 1105-1127. DOI: 10.1007/s00018-007-6484-5.
- [6] Misiewicz I, Skupińska K, Kowalska E, et al. Sulforaphane-mediated induction of a phase 2 detoxifying enzyme NAD(P)H: quinone reductase and apoptosis in human lymphoblastoid cells [J]. Acta Biochim Pol, 2004, 51(3): 711-721. DOI: 045103711.
- [7] Egger AL, Gay KA, Mesecar AD. Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2 [J]. Mol Nutr Food Res, 2008, 52 Suppl 1: S84-94. DOI: 10.1002/mnfr.200700249.
- [8] Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(22): 8137-8151.
- [9] 苏静, 王强, 刘玉震. 莱菔硫烷对体外培养牛眼小梁细胞硫氧还蛋白表达的影响及其机制 [J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(6): 504-508. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.006.
- [10] Wagner AE, Ernst I, Iori R, et al. Sulforaphane but not ascorbigen, indole-3-carbinole and ascorbic acid activates the transcription factor Nrf2 and induces phase-2 and antioxidant enzymes in human keratinocytes in culture [J]. Exp Dermatol, 2010, 19(2): 137-144. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.00928.x.
- [11] Matsui TA, Murata H, Sakabe T, et al. Sulforaphane induces cell cycle arrest and apoptosis in murine osteosarcoma cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo* [J]. Oncol Rep, 2007, 18(5): 1263-1268.
- [12] Cheung KL, Kong AN. Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention [J]. AAPS J, 2010, 12(1): 87-97. DOI: 10.1208/s12248-009-9162-8.
- [13] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- [14] Yang Z, Klionsky DJ. Eat or be eaten: a history of macroautophagy [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 814-822. DOI: 10.1038/ncb0910-814.
- [15] Costello MJ, Brennan LA, Basu S, et al. Autophagy and mitophagy participate in ocular lens organelle degradation [J]. Exp Eye Res, 2013, 116: 141-150. DOI: 10.1016/j.exer.2013.08.017.
- [16] Brennan LA, Kantorow WL, Chauss D, et al. Spatial expression patterns of autophagy genes in the eye lens and induction of autophagy in lens cells [J]. Mol Vis, 2012, 18: 1773-1786.
- [17] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. Autophagy, 2012, 8(4): 445-544. DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356.
- [18] Portes AL, Almeida AC, Allodi S, et al. Trypan blue staining for capsulorhexis; ultrastructural effect on lens epithelial cells and capsules [J]. J Cataract Refract Surg, 2010, 36(4): 582-587. DOI: 10.1016/j.jcrs.2009.11.005.
- [19] Chandler HL, Gervais KJ, Lutz EA, et al. Cyclosporine A prevents *ex vivo* PCO formation through induction of autophagy-mediated cell death [J]. Exp Eye Res, 2015, 134: 63-72. DOI: 10.1016/j.exer.2015.03.020.

(收稿日期: 2016-11-12)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)