

· 实验研究 ·

转化生长因子 β_2 对人眼 Tenon 囊成纤维细胞中赖氨酰氧化酶家族表达的诱导作用

郭凤 朱晓燕 陈侠 张勇 谭燕 吴晓凤 刘锐 李磊 鲜光军 谢琳

400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科(郭凤、朱晓燕、陈侠、张勇、鲜光军、谢琳),野战外科研究所研究室(谭燕、吴晓凤、刘锐、李磊)

通信作者:谢琳,Email:xielin_66@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.04.007

【摘要】 背景 研究表明,转化生长因子 β_2 (TGF- β_2) 促进 Tenon 囊成纤维细胞(TFs)的活化,在青光眼滤过术后结膜下纤维化过程中发挥作用,但其作用机制尚未完全明了。赖氨酰氧化酶家族(LOXs)与细胞外基质重塑有关,了解青光眼术后滤过泡的纤维化过程中 TGF- β_2 与 LOXs 活化的关系对青光眼滤过术后滤过泡瘢痕化的防治具有重要意义。目的 观察 TGF- β_2 对体外培养的人眼 TFs 中 LOXs 蛋白表达变化的影响。方法 将培养的第 4~8 代人 TFs 分为正常对照组和不同质量浓度 TGF- β_2 培养组,分别在细胞培养液中添加终质量浓度为 2、4、8 和 16 ng/ml TGF- β_2 继续培养 24 h,采用 Western blot 法测定不同质量浓度 TGF- β_2 培养组细胞中 LOXs 蛋白表达的变化,确定最适 TGF- β_2 刺激质量浓度。用 4 ng/ml TGF- β_2 分别处理培养的 TFs 6、12、24 和 48 h,采用 Western blot 法测定各时间点细胞中 LOXs 蛋白表达的变化。采用细胞免疫荧光法分别检测正常对照组和 4 ng/ml TGF- β_2 培养组 TFs 中 LOX 蛋白的表达及其在细胞中的分布。结果 Western blot 法检测显示,正常对照组及 2、4、8 和 16 ng/ml TGF- β_2 培养组人 TFs 中 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 及 LOXL4 蛋白的表达强度均随 TGF- β_2 质量浓度的升高而增加,各组间细胞中 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 蛋白相对表达量的总体比较,差异均有统计学意义($F=37.338、13.438、31.067、11.767、15.167$,均 $P<0.01$),细胞中 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 及 LOXL4 蛋白相对表达量的升高呈 TGF- β_2 剂量依赖性。正常对照组及 4 ng/ml TGF- β_2 刺激人 TFs 后 6、12、24 和 48 h 组,细胞中 LOXL2 蛋白的相对表达量分别为 $0.68\pm 0.07、1.09\pm 0.10、1.32\pm 0.07、1.50\pm 0.06$ 和 1.89 ± 0.12 ,其表达强度呈时间依赖性,总体比较差异有统计学意义($F=82.832,P=0.000$)。正常对照组人 TFs 中 LOX 蛋白表达强度较弱,主要位于细胞质中,TGF- β_2 培养组细胞中 LOX 蛋白的表达强度明显强于正常对照组,且表达 LOX 蛋白的细胞增多。结论 正常人 TFs 中可见 LOXs 呈低表达,TGF- β_2 以剂量和时间依赖的方式上调人 TFs 中 LOXs 蛋白的表达。这个结果为青光眼术后滤过泡纤维化的相关防治研究提供了实验依据。

【关键词】 青光眼; 滤过手术/不良反应; Tenon 囊; 成纤维细胞; 人; 赖氨酰氧化酶; 转化生长因子 β_2 /药物作用; 细胞培养

基金项目:国家自然科学基金项目(81470629)

Induction of transforming growth factor- β_2 to the expression of lysyl oxidases in human Tenon capsule fibroblasts in vitro Guo Feng, Zhu Xiaoyan, Chen Xia, Zhang Yong, Tan Yan, Wu Xiaofeng, Liu Rui, Li Lei, Xian Guangjun, Xie Lin

Department of Ophthalmology (Guo F, Zhu XY, Chen X, Zhang Y, Xian GJ, Xie L), State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1 (Tan Y, Wu XF, Liu R, Li L), Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: Xie Lin, Email:xielin_66@163.com

【Abstract】 **Background** Researches showed that transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2) promotes the activity of human Tenon capsular fibroblasts (TFs), which plays a role in the scarring of filtering blebs after anti-glaucoma surgery. However, its mechanism is not fully clear. Lysyl oxidases (LOXs) are important extracellular matrix proteases which can catalyze the cross-linking of collagen and elastin. Investigating the impact of TGF- β_2 on the expression of LOXs has a great significance for the understanding of the pathogenesis of filtering bleb scarring and its

prevention. **Objective** This study was to investigate the effect of TGF- β_2 on the expression of LOXs in cultured human TFs. **Methods** The TFs at 4-8 generations were divided into normal control group and different concentrations of TGF- β_2 treated-groups, and 100, 200, 400, 800 μl of TGF- β_2 with the final concentration of 2, 4, 8 and 16 ng/ml was added into the medium to treat human TFs respectively for 24 hours. The LOXs in the cells were detected by Western blot to determine the optimal dose of TGF- β_2 . The 4 ng/ml TGF- β_2 (200 μl) was used to treat human TFs for 6, 12, 24 and 48 hours respectively, and the change of LOXs expression in the cells over time was assayed by Western blot. The expression and distribution of LOX protein in the normal cells and TGF- β_2 -treated cells was detected by using immunofluorescence technique. This study was approved by Daping Hospital of Third Military Medical University Ethic Commission. The guardians of the patients who offered the specimen knew the purpose of the study and signed informed consent. **Results** Western blot assay showed that the expressions of LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 and LOXL4 in the cells were gradually elevated from the normal control group and 2, 4, 8, 16 ng/ml TGF- β_2 -treated groups, showing significant differences among the groups ($F = 37.338, 13.438, 31.067, 11.767, 15.167$, all at $P < 0.01$). The expression of LOXL2 protein in the cells was $0.68 \pm 0.07, 1.09 \pm 0.10, 1.32 \pm 0.07, 1.50 \pm 0.06$ and 1.89 ± 0.12 in the normal control group and 6-, 12-, 24- and 48-hour groups respectively after 4 ng/ml TGF- β_2 treatment, with a significant increase over time ($F = 82.832, P = 0.000$). The expression of LOX was weak in the normal cultured TFs, while the fluorescence intensity of LOX expression was evidently enhanced in the cytoplasm of the cells in the TGF- β_2 -treated group. **Conclusions** TGF- β_2 upregulates the expressions of LOXs in human TFs in a dose- and time-dependent manner, which probably offers a basis for the further study on the prevention of filtering bleb scarring after glaucoma surgery.

[**Key words**] Glaucoma; Filtering surgery/adverse effects; Tenon capsule; Fibroblasts; Humans; Protein-lysine 6-oxidase/metabolism; Transforming growth factor beta 2/pharmacology; Cells, cultured

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470629)

目前,滤过性手术仍是治疗青光眼的主要方法之一,但术后可因滤过泡区纤维化及细胞外基质重塑导致瘢痕形成而手术失败,已证明 Tenon 囊成纤维细胞 (Tenon fibroblasts, TFs) 是该过程中的主要参与细胞^[1]。研究显示,转化生长因子 β_2 (transforming growth factor- β_2 , TGF- β_2) 在青光眼滤过术后结膜下纤维化过程中发挥重要作用,其活化程度与瘢痕的形成密切相关^[2-3]。赖氨酰氧化酶家族 (lysine oxidases, LOXs) 蛋白是细胞外铜依赖性单胺氧化酶,可催化胶原和弹性蛋白之间发生交联反应,进而交织成稳定的网状结构^[4-5]。van Bergen 等^[6]证实 LOX 及 LOX 配体 (LOX ligand, LOXL) 2 与青光眼术后瘢痕形成关系密切,但 LOXs 参与瘢痕形成的机制仍有待阐明。目前眼科关于 LOXs 的研究多集中于其在小梁细胞中的表达情况,其在 Tenon 囊成纤维细胞中表达情况的系统研究少见。本课题组前期研究证实, TGF- β_2 可促进人眼 TFs 转分化^[3],然而, TGF- β_2 究竟如何调节 LOXs 尚未完全阐明。本研究主要探讨 TGF- β_2 对人眼 TFs 中 LOXs 表达的作用,为滤过区瘢痕化过程的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 小儿斜视术中取出多余 Tenon 囊组织,贴壁法培养得到原代 TFs^[3,7-8],取第 4~8 代的细胞用于实验。本研究经第三军医大学大坪医院伦理委员会审核通过[医研伦审第(2010)010号]。患者监护人知晓本研究的目的,并签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、质量浓度 0.25% 胰蛋白酶、青-链霉素混合液 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (澳大利亚 Gibco 公司); 人重组 TGF- β_2 (美国 Peprotech 公司); DylightTM 549 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) (1:500, GAR5492, 美国联科生物公司); 兔抗人 LOXs 单克隆抗体 (1:100, ab174316)、小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 (1:5000, ab6276)、兔抗人 LOX 单克隆抗体 (1:1000, ab174316)、兔抗人 LOXL1 多克隆抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ab81488)、兔抗人 LOXL2-C-末端单克隆抗体 (ab179810, 1:1000)、兔抗人 LOXL3-C-末端多克隆抗体 (1:100, ab171315)、兔抗人 LOXL4 多克隆抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ab88186) (美国 Abcam 公司); 山羊抗小鼠辣根酶标记 IgG (1:5000, ZB2305)、山羊抗兔辣根酶标记 IgG (1:5000, ZB2301) (北京中杉金桥公司)。CO₂ 细胞培养箱 (德国 Heraeus 公司); 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); Model450 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); Fusion FX5 化学发光成像系统 (法国

Vilber 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 法检测细胞中 LOXs 蛋白的表达

将 TFs 分为正常对照组和不同质量浓度 (2、4、8、16 ng/ml) TGF- β_2 培养组, 正常对照组 TFs 用 DMEM 培养基培养, TGF- β_2 培养组在培养液中分别添加 0.1 $\mu\text{g/ml}$ TGF- β_2 100、200、400、800 μl , 使 TGF- β_2 终质量浓度分别为 2、4、8、16 ng/ml, 继续培养 24 h, 测定不同质量浓度 TGF- β_2 培养组细胞中 LOXs 蛋白表达变化, 确定最适 TGF- β_2 刺激质量浓度。TGF- β_2 刺激细胞后去除培养液, 每瓶细胞中加入 150 μl 细胞裂解液冰上放置 20 min, 用细胞刮刀将细胞刮下, 离心半径 3 cm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 2 min, 收集上清液。BCA 蛋白定量法检测蛋白浓度。取 50 μg 蛋白上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将凝胶上蛋白转移至 PVDF 膜上, 丽春红复染观察蛋白条带, 根据目标条带剪膜, 0.5 g/ml 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 滴加相应一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 TBST 液洗膜 3 次, 每次 10 min, 滴加相应二抗室温孵育 1 h, TBST 液洗膜 3 次, 每次 15 min, 将 ECL 发光液滴在膜上曝光。采用 Fusion FX5 化学发光成像系统进行成像, 用 Quantity One 程序 (美国 Bio-Rad 公司) 对条带中心密度进行分析, 以 β -actin 作为内参。目的蛋白的相对表达量 = 目标蛋白灰度值 / 内参灰度值。实验重复 3 次。

1.2.2 Western blot 法检测 TGF- β_2 作用不同时间点 TFs 中 LOXs 蛋白的表达变化

依据不同质量浓度 TGF- β_2 刺激结果选定 4 ng/ml TGF- β_2 为最适刺激质量浓度。将细胞以 4×10^4 /ml 均匀接种于 100 ml 培养瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中静置培养, 将培养细胞分为正常对照组和 4 ng/ml TGF- β_2 培养组, 在细胞培养液中添加 4 ng/ml TGF- β_2 (200 μl) 分别作用 6、12、24 和 48 h, 采用 Western blot 法检测 TGF- β_2 作用不同时间点 TFs 中 LOXs 蛋白的表达变化, 检测步骤同 1.2.1。实验重复 3 次。

1.2.3 免疫荧光法检测细胞中 LOX 的分布及定位

依据不同质量浓度 TGF- β_2 刺激结果选定 4 ng/ml TGF- β_2 为最适刺激质量浓度。将细胞以 3×10^5 /ml 密度接种于已放置专用细胞爬片的 12 孔板内, 将细胞分为正常对照组和 4 ng/ml TGF- β_2 培养组, 后者在细胞培养液中添加 0.1 $\mu\text{g/ml}$ TGF- β_2 40 μl (终质量浓度为 4 ng/ml), 待细胞生长至 80% 融合时用质量分数 4% 多聚甲醛室温下固定细胞 20 min, 以质量分数 0.3% TritonX-100 透化细胞 20 min, 体积分数 5% 山羊血清室温下封闭 1 h。滴加抗 LOX 一抗 (1:100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱

孵育过夜。暗房中滴加相应免疫荧光二抗 (1:500), 室温下孵育 2 h, DAPI 染核 2 min (1:1 000), PBS 清洗后取出载玻片, 封片, 荧光显微镜下观察并拍照, 细胞质呈红色荧光者为 LOX 蛋白表达阳性。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件 (IBM-SPSS, Chicago, IL) 进行统计分析。本研究中检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计, 正常对照组及不同质量浓度 TGF- β_2 处理组或不同时间点 TGF- β_2 处理组间细胞中 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 蛋白相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 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 LOX 在各组 TFs 中的表达及定位

荧光显微镜下 LOX 蛋白呈红色束状荧光, 位于核周的细胞质中, 与细胞形态一致。在正常人眼 TFs 中 LOX 蛋白表达量少, 荧光强度弱 (图 1A ~ C)。4 ng/ml TGF- β_2 培养组刺激细胞后 24 h, 细胞中 LOX 蛋白表达的红色荧光较正常对照组明显增强 (图 1D ~ F)。

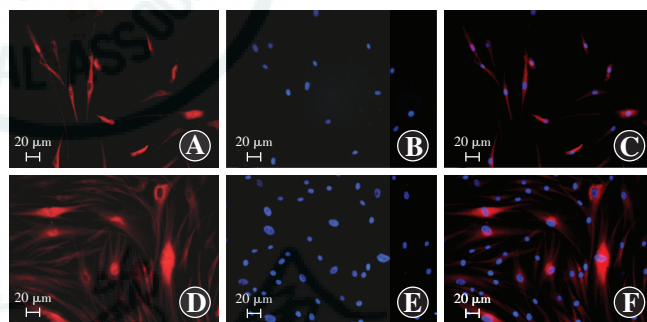


图 1 各组细胞中 LOX 蛋白表达 (标尺 = 20 μm) A: 正常对照组细胞中可见 LOX 蛋白表达, 细胞质中呈红色荧光 (DylightTM 549) B: 正常对照组细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) C: 图 A 与图 B 的融合图 D: TGF- β_2 培养组细胞中 LOX 蛋白表达的荧光明显增强 (DylightTM 549) E: 4 ng/ml TGF- β_2 培养组细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) F: 图 D 与图 E 的融合图

2.2 不同质量浓度 TGF- β_2 培养组 TFs 中 LOXs 蛋白相对表达量的比较

Western blot 法检测结果显示, 随着 TGF- β_2 质量浓度的增加, TFs 中 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 蛋白表达条带逐渐增强 (图 2)。分别用 2、4、8、16 ng/ml TGF- β_2 处理 TFs 后 24 h, 细胞中 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 蛋白相对表达量随 TGF- β_2 质量浓度的升高而增加, 总体比较差异均有统

计学意义 ($F = 37.338、13.438、31.067、11.767、15.167$, 均 $P < 0.01$) (图 2, 表 1), 其中与正常对照组比较, 2 ng/ml TGF- β_2 处理组细胞中 LOX、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 蛋白相对表达量均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P = 0.000、0.048、0.027、0.005$); 与 2 ng/ml TGF- β_2 处理组相比, 4 ng/ml TGF- β_2 处理组细胞中 LOX、LOXL1、LOXL2 蛋白相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义 ($P = 0.033、0.035、0.032$); 与 4 ng/ml TGF- β_2 处理组相比, 8 ng/ml TGF- β_2 处理组细胞中 LOXs、LOXL2 蛋白相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义 ($P = 0.026、0.006$); 与 8 ng/ml TGF- β_2 处理组比较, 16 ng/ml TGF- β_2 处理组细胞中 LOXL3 蛋白相对表达量明显升高, 差异有统计学意义 ($P = 0.019$) (表 1)。

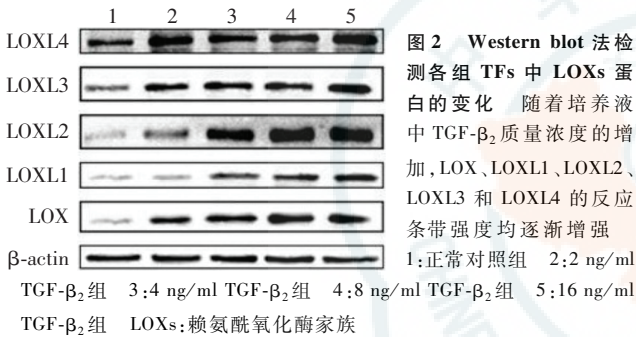


图 2 Western blot 法检测各组 TFs 中 LOXs 蛋白的变化 随着培养液中 TGF- β_2 质量浓度的增加, LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 的反应条带强度均逐渐增强

1: 正常对照组 2: 2 ng/ml TGF- β_2 组 3: 4 ng/ml TGF- β_2 组 4: 8 ng/ml TGF- β_2 组 5: 16 ng/ml TGF- β_2 组 LOXs: 赖氨酰氧化酶家族

表 1 不同质量浓度 TGF- β_2 处理后 TFs 中 LOXs 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

TGF- β_2 质量浓度 (ng/ml)	样本量	LOX	LOXL1	LOXL2	LOXL3	LOXL4
0	3	0.34±0.07	0.38±0.11	0.40±0.01	0.54±0.13	0.58±0.07
2	3	0.86±0.04 ^a	0.42±0.10	0.72±0.08 ^a	0.89±0.17 ^a	1.00±0.25 ^a
4	3	1.11±0.16 ^b	0.68±0.12 ^b	1.07±0.27 ^b	1.06±0.23	1.17±0.11
8	3	1.37±0.13 ^c	0.82±0.14	1.57±0.20 ^c	1.07±0.19	1.34±0.13
16	3	1.40±0.16	1.03±0.16	1.73±0.17	1.45±0.08 ^d	1.37±0.10
F 值		37.338	13.438	31.067	11.767	15.167
P 值		0.000	0.000	0.000	0.001	0.000

注: 与各自的 0 ng/ml TGF- β_2 组 (正常对照组) 比较, ^a $P < 0.05$; 与各自的 2 ng/ml TGF- β_2 组比较, ^b $P < 0.05$; 与各自的 4 ng/ml TGF- β_2 组比较, ^c $P < 0.05$; 与各自的 8 ng/ml TGF- β_2 组比较, ^d $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) TGF: 转化生长因子; TFs: Tenon 囊成纤维细胞; LOXs: 赖氨酰氧化酶家族

2.3 TGF- β_2 作用后不同时间点 TFs 中 LOXs 蛋白表达的变化

与正常对照组比较, 4 ng/ml TGF- β_2 作用后 6 h LOXs 蛋白相对表达量升高, LOX 和 LOXL2 蛋白相对表达量随着 TGF- β_2 作用时间的延长而增强, TGF- β_2 作用后 24 h TFs 中 LOX 相对表达量达峰。TGF- β_2 作用后 12 h 细胞中 LOXL1 和 LOXL3 蛋白相对表达量逐渐

下降, LOXL4 蛋白相对表达量在 TGF- β_2 作用后 12 h 达稳定状态 (图 3)。TGF- β_2 作用后各时间点细胞中 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 蛋白的相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 57.458、10.670、82.832、27.097、78.849$, 均 $P < 0.01$); 与正常对照组比较, TGF- β_2 作用后 6 h 细胞中 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 蛋白的相对表达量均明显增加, 差异均有统计学意义 ($P = 0.001、0.022、0.000、0.004、0.001$); TGF- β_2 作用后 12 h 较 6 h 细胞中 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 蛋白的相对表达量均明显增加, 差异均有统计学意义 ($P = 0.003、0.004、0.009、0.017、0.007$); TGF- β_2 作用后 24 h 较作用后 12 h 细胞中 LOX、LOXL1、LOXL2 和 LOXL4 蛋白的相对表达量均明显增加, 差异均有统计学意义 ($P = 0.006、0.005、0.024、0.000$); 与 TGF- β_2 作用后 24 h 比较, 作用后 48 h 细胞中 LOXL2 蛋白的相对表达量明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), LOXL4 蛋白的相对表达量降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (表 2)。

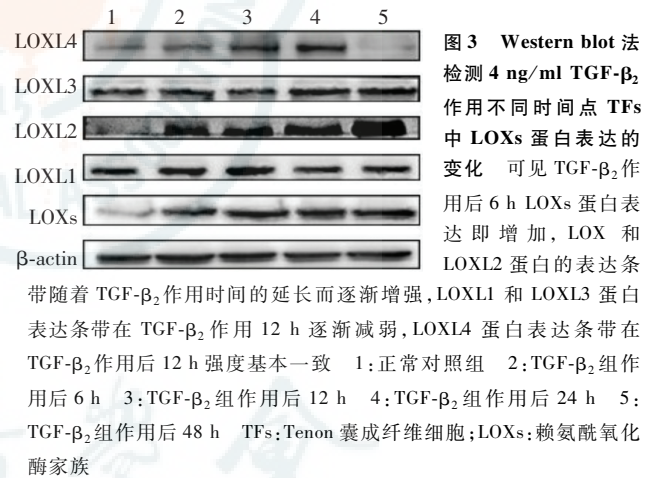


图 3 Western blot 法检测 4 ng/ml TGF- β_2 作用不同时间点 TFs 中 LOXs 蛋白表达的变化 可见 TGF- β_2 作用后 6 h LOXs 蛋白表达即增加, LOX 和 LOXL2 蛋白的表达条带随着 TGF- β_2 作用时间的延长而逐渐增强, LOXL1 和 LOXL3 蛋白表达条带在 TGF- β_2 作用 12 h 逐渐减弱, LOXL4 蛋白表达条带在 TGF- β_2 作用后 12 h 强度基本一致 1: 正常对照组 2: TGF- β_2 组作用后 6 h 3: TGF- β_2 组作用后 12 h 4: TGF- β_2 组作用后 24 h 5: TGF- β_2 组作用后 48 h TFs: Tenon 囊成纤维细胞; LOXs: 赖氨酰氧化酶家族

表 2 4 ng/ml TGF- β_2 作用后不同时间点 TFs 中 LOXs 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

TGF- β_2 作用时间 (h)	样本量	LOX	LOXL1	LOXL2	LOXL3	LOXL4
0	3	0.44±0.05	0.67±0.07	0.68±0.07	0.63±0.02	0.33±0.05
6	3	0.79±0.10 ^a	0.96±0.07 ^b	1.09±0.10 ^a	0.94±0.07 ^a	0.62±0.05 ^a
12	3	1.08±0.13 ^c	1.35±0.23 ^c	1.32±0.07 ^c	1.19±0.02 ^d	0.85±0.11 ^c
24	3	1.34±0.12 ^e	0.98±0.12 ^e	1.50±0.06 ^f	1.31±0.14	1.35±0.12 ^e
48	3	1.42±0.03	1.09±0.08	1.89±0.12 ^g	1.42±0.18	0.37±0.02 ^g
F 值		57.458	10.670	82.832	27.097	78.849
P 值		0.000	0.001	0.000	0.000	0.000

注: 与各自的 0 h (正常对照组) 比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与各自的 6 h 值比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$; 与各自的 12 h 值比较, ^e $P < 0.01$, ^f $P < 0.05$; 与各自的 24 h 值比较, ^g $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) TGF: 转化生长因子; TFs: Tenon 囊成纤维细胞; LOXs: 赖氨酰氧化酶家族

3 讨论

青光眼滤过术后失败的主要原因是滤过区瘢痕形成。目前,丝裂霉素 C 和 5-氟尿嘧啶仍然是青光眼滤过术后抗瘢痕化治疗的常用药物,但应用后可有明显的不良反应,限制了其临床上的应用^[1]。目前,关于抗纤维化形成的药物研究已向细胞甚至基因水平拓展^[9-10],然而每种现存的治疗方案都存在一定的缺陷,研制抗瘢痕化效果好、不良反应少的药物仍是主要的研究方向。

研究认为 LOXL1 参与剥脱性青光眼的发病机制^[11],还有研究表明 LOXL3 酶缺失可导致腭裂及脊椎发育畸形,提示 LOXL3 参与骨发育^[12]。Park 等^[13]的研究发现,原发性开角型青光眼患眼房水中 LOXL2 水平明显升高,且房水中 LOXL2 的水平与术后滤过泡的成功率呈负相关,提示 LOXL2 可能与纤维化疾病的发生和发展有关。研究发现,LOXL4 与头颈部鳞状上皮癌相关^[14],提示不同类型的 LOXs 在不同疾病的发病机制中起着不同的作用,因此了解不同疾病中 LOXs 在细胞或组织中表达的差异有助于不同疾病发病机制的研究。

LOXs 是一种存在于哺乳动物体内的铜依赖性氨基酰氧化酶,可促进胶原蛋白的成熟和弹性蛋白的形成以及胶原蛋白和弹性蛋白之间的交联,在组织的修复过程中具有重要作用^[15-16]。创伤或者炎症的组织中 LOX 过度表达,进而引起细胞外基质的过度交联,发生渐进性纤维化。已有研究表明,LOX 与肝脏和肺脏组织的纤维化、神经变性疾病及心血管疾病引起的纤维化关系密切^[17-19]。van Bergen 等^[6]研究证实,LOXs 及 LOXL2 与青光眼术后滤过区组织瘢痕形成有关,抗青光眼术后 3 d 局部组织中 LOX 及 LOXL2 的表达即上调。研究还发现,原发性开角型青光眼患者 Tenon 囊及房水中 LOXL2 和房水中 TGF- β_2 水平明显升高,且与青光眼滤过术后的成功率呈负相关^[13],而本研究则发现 TGF- β_2 刺激后 TFs 中均有 LOXs 蛋白的表达,这些研究结果均提示 LOXs 可能参与纤维化过程。

TGF- β 在哺乳动物中普遍存在,主要包含 TGF- β_1 、TGF- β_2 和 TGF- β_3 3 种类型^[20],青光眼滤过术后房水中升高的 TGF 主要以 TGF- β_2 为主^[3],目前认为 TGF- β_2 是 LOXs 的重要上游因子,TGF- β_2 与其受体 T β R II 结合后通过经典 Smad 及 JNK/AP-1 信号通路,上调 LOXs 的基因转录水平,LOXs 蛋白表达升高,引起瘢痕形成^[21]。为了探究 TGF- β_2 在 TFs 中是否有同样的作用,本研究采用 TGF- β_2 刺激成纤维细胞,发现 TGF- β_2

可以诱导 LOXs 的表达,免疫荧光检测提示 TGF- β_2 刺激细胞后 24 h,核周分泌的 LOX 较对照组明显增多。本研究还发现 TGF- β_2 对 LOX、LOXL2 及 LOXL3 蛋白表达量的影响呈剂量依赖性,LOXL1 和 LOXL4 随着 TGF- β_2 剂量的升高一定程度上增加,但没有明显的剂量依赖性。此外,LOX 在 TFs 中的表达随着 TGF- β_2 作用时间的延长而增强,至作用后 24 h 达到饱和状态,LOXL2 表达仍呈持续增强趋势,LOXL1 蛋白的表达在 TGF- β_2 作用后 12 h 达峰值,此后逐渐下降,而 LOXL3 蛋白表达至 TGF- β_2 作用后 12 h 达稳定状态,LOXL4 蛋白表达在 TGF- β_2 作用后 24 h 此效应逐渐下降,这些结果表明 TGF- β_2 对人 TFs 中 LOXs 表达的诱导作用呈质量浓度和时间的双重依赖性。

综上所述,本研究结果表明 LOXs 家族蛋白的表达受 TGF- β_2 的调控,且 TGF- β_2 调控人 TFs 中 LOXs 表达的作用呈剂量和时间依赖性。因此本研究推测,青光眼术后滤过道瘢痕化形成的分子机制可能是 TGF- β_2 诱导 LOXs 家族蛋白的表达上调,从而促进胶原与弹性蛋白之间交联,引起滤过泡区纤维化病变有关,这个研究结果为防治青光眼术后滤过泡纤维化的进一步研究提供了实验依据。

参考文献

- [1] Luo YH, Ouyang PB, Tian J, et al. Rosiglitazone inhibits TGF- β 1 induced activation of human Tenon fibroblasts via p38 signal pathway [J/OL]. PLoS One, 2014, 9 (8) : e105796 [2016-04-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4140818/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0105796.
- [2] Esson DW, Neelakantan A, Iyer SA, et al. Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtration surgery in a rabbit model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45 (2) : 485-491.
- [3] Zhu X, Li L, Zou L, et al. A novel aptamer targeting TGF- β receptor II inhibits transdifferentiation of human Tenon's fibroblasts into myofibroblast [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53 (11) : 6897-6903. DOI: 10.1167/iovs.12-10198.
- [4] Rodríguez C, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target [J]. Drug News Perspect, 2008, 21 (4) : 218-224. DOI: 10.1358/dnp.2008.21.4.1213351.
- [5] Coral K, Angayarkanni N, Madhavan J, et al. Lysyl oxidase activity in the ocular tissues and the role of LOX in proliferative diabetic retinopathy and rhegmatogenous retinal detachment [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49 (11) : 4746-4752. DOI: 10.1167/iovs.07-1550.
- [6] van Bergen T, Marshall D, van de Veire S, et al. The role of LOX and LOXL2 in scar formation after glaucoma surgery [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54 (8) : 5788-5796. DOI: 10.1167/iovs.13-11696.
- [7] 陈侠,李磊,谢琳.壳聚糖纳米微粒荧光探针的制备及特性研究 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35 (10) : 992-995.
Chen X, Li L, Xie L. Preparation and characterization of fluorescent chitosan nanoprobe [J]. Acta Acad Med Milit Tert, 2013, 35 (10) : 992-995.
- [8] 朱晓燕,李磊,鲜光军,等.转化生长因子- β_2 诱导人 Tenon 囊成纤维细胞转化及其在瘢痕形成中的作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31 (3) : 215-219. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.03.002.

- Zhu XY, Li L, Xian GJ, et al. Effects of transforming growth factor- β_2 on human Tenon fibroblasts transformation and scarring after glaucoma filtration surgery [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(3): 215-219. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.03.002.
- [9] Rosenbloom J, Ren S, Macarak E. New frontiers in fibrotic disease therapies: the focus of the Joan and Joel Rosenbloom Center for fibrotic diseases at Thomas Jefferson University [J]. Matrix Biol, 2016, 51: 14-25. DOI:10.1016/j.matbio.2016.01.011.
- [10] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease [J]. Nat Med, 2012, 18(7): 1028-1040. DOI:10.1038/nm.2807.
- [11] Zenkel M, Krysta A, Pasutto F, et al. Regulation of lysyl oxidase-like 1 (LOXL1) and elastin-related genes by pathogenic factors associated with pseudoexfoliation syndrome [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(11): 8488-8495. DOI:10.1167/iovs.11-8361.
- [12] Zhang J, Yang R, Liu Z, et al. Loss of lysyl oxidase-like 3 causes cleft palate and spinal deformity in mice [J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(21): 6174-6185. DOI:10.1093/hmg/ddv333.
- [13] Park HY, Kim JH, Park CK. Lysyl oxidase-like 2 level and glaucoma surgical outcomes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(5): 3337-3343. DOI:10.1167/iovs.14-14027.
- [14] Görög T, Quabius ES, Heidebrecht H, et al. Lysyl oxidase like-4 monoclonal antibody demonstrates therapeutic effect against head and neck squamous cell carcinoma cells and xenografts [J]. Int J Cancer, 2016, 138(10): 2529-2538. DOI:10.1002/ijc.29986.
- [15] Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell [J]. J Cell Biochem, 2003, 88(4): 660-672. DOI:10.1002/jcb.10413.
- [16] Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology [J]. Matrix Biol, 1998, 16(7): 387-398.
- [17] Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment [J]. Nat Med, 2010, 16(9): 1009-1017. DOI:10.1038/nm.2208.
- [18] López B, González A, Hermida N, et al. Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects [J/OL]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 299(1): H1-9 [2016-07-10]. <http://ajpheart.physiology.org/content/299/1/H1.long>. DOI:10.1152/ajpheart.00335.2010.
- [19] Vadasz Z, Kessler O, Akiri G, et al. Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2 [J]. J Hepatol, 2005, 43(3): 499-507.
- [20] Cordeiro MF. Role of transforming growth factor beta in conjunctival scarring [J]. Clin Sci (Lond), 2003, 104(2): 181-187.
- [21] Sethi A, Mao W, Wordinger RJ, et al. Transforming growth factor-beta induces extracellular matrix protein cross-linking lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(8): 5240-5250. DOI:10.1167/iovs.11-7287.

(收稿日期:2016-12-06)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)

读者·作者·编者

本刊投稿方式

投稿请登陆中华医学会网站 (<http://www.cma.org.cn>), 登录后点击“业务中心”, 经中华医学会远程稿件处理系统 (<http://www.cma.org.cn/ywzx/index.html>) 或中华医学会杂志社网站 (<http://www.medline.org.cn/>), 根据提示进行注册后投稿。投稿时请使用 Word 格式 (.doc 文件类型), 投稿后请注意自留原稿, 并保留论文相关的原始资料, 以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”, 填写有关项目并请每位作者亲笔签字, 加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部, 其中作者签名顺序和作者单位著录名称应与投稿时文章中著录的相一致, 如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意: (1) 在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投, 但投稿时应向编辑部说明, 非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。(2) 作者须告知与该研究有关的利益冲突, 如该研究被某机构资金资助的声明或与审稿人的利益关系。(3) 如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。

本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则, 郑重承诺审稿过程中尊重和保护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件, 编辑部将告知作者专家的审理意见, 对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议, 但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再评的稿件, 如 2 个月没有修回, 视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过 Email 发出, 投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起, 即视为双方建立合约关系, 作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段, 作者不应提出自撤稿件, 在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者, 编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿, 作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文, 本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业知能进行文字加工、修改和删减, 修改后的稿件作者须认真校对核实, 修改涉及文章的核心内容时双方应进行沟通并征得作者同意。除了编辑方面的技术加工以外, 作者对已经发表论文的全部内容文责自负。稿件编辑流程中编辑退回作者修改的稿件逾期 2 个月不修回者, 视作自行撤稿。

(本刊编辑部)