

· 实验研究 ·

Dickkopf-1 对人晶状体上皮细胞增生的抑制作用及其生物学机制

张利民 包秀丽

内蒙古医科大学附属医院眼科, 呼和浩特 010050

通信作者: 包秀丽, Email: ophbaxili@hotmail.com

【摘要】目的 探讨 DKK1(Dickkopf1)通过 Wnt/β-catenin 信号通路对人晶状体上皮细胞(LECs)增生的影响及其可能的作用机制,为晶状体后囊膜混浊(PCO)的临床治疗提供新靶点。**方法** 将人 LECs 系(SRA 01/04 细胞)分为 Wnt3a 过表达组、DKK1 组和对照组。Wnt3a 过表达组采用脂质体介导转染技术将 Wnt3a cDNA 表达载体瞬时转染入人 SRA 01/04 细胞构建 PCO 模型。DKK1 组转染 Wnt3a cDNA 表达载体后 48 h 在培养基中加入 100 μg/ml DKK1 进行干预,对照组细胞转染 pcDNA3-HA 表达载体。采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测各组细胞生存率;采用免疫细胞化学法检测各组细胞增生细胞核抗原(PCNA)蛋白的表达;采用 Western blot 法检测各组细胞中 Wnt3a、CyclinD1 和 C-Myc 蛋白的表达;采用免疫荧光技术法检测并定位各组细胞中 β-catenin 的表达。**结果** Western blot 检测发现,Wnt3a 过表达组 Wnt3a 蛋白的相对表达量为 0.84 ± 0.06 , 高于对照组的 0.49 ± 0.07 , 差异有统计学意义($t = 3.704, P < 0.05$)。CCK-8 试验显示, 不同时点各组细胞生存率总体比较差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 10.910, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 6.041, P < 0.05$), 其中 Wnt3a 过表达组细胞生存率明显高于对照组, DKK1 组细胞生存率明显低于 Wnt3a 过表达组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。对照组、Wnt3a 过表达组和 DKK1 组细胞中 PCNA 阳性表达率分别为($9.4 \pm 1.4\%$)、($43.4 \pm 5.4\%$)和($14.2 \pm 2.3\%$), 总体比较差异有统计学意义($F = 28.250, P < 0.05$), 其中 DKK1 组和对照组细胞中 PCNA 阳性表达率均低于 Wnt3a 过表达组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。免疫荧光技术检测发现,Wnt3a 过表达组 β-catenin 蛋白主要表达于细胞质和细胞核, 对照组 β-catenin 蛋白仅分布于细胞质, DKK1 组 β-catenin 蛋白分布于细胞质, 少量分布于细胞核。Western blot 法检测显示, 对照组、Wnt3a 过表达组和 DKK1 组 C-Myc 相对表达量分别为 0.59 ± 0.05 、 0.93 ± 0.02 和 0.47 ± 0.08 , CyclinD1 的相对表达量分别为 0.64 ± 0.07 、 0.84 ± 0.03 和 0.55 ± 0.10 , 总体比较差异均有统计学意义($F = 20.580, 5.040$, 均 $P < 0.05$); 其中 Wnt3a 过表达组 C-Myc 和 CyclinD1 相对表达量高于对照组和 DKK1 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** DKK1 抑制 SRA01/04 细胞中 Wnt3a 过表达诱导的 Wnt/β-catenin 信号通路活化, 下游靶蛋白 CyclinD1 和 C-Myc 表达下调, 可能是 DKK1 抑制人 LECs 增生的生物学机制。

【关键词】 Dickkopf 家族; 晶状体上皮细胞; Wnt/β-catenin 信号通路; 细胞增生; 后囊膜混浊

基金项目: 国家自然科学基金项目(81360145)

DOI: 10.3760/cma.j.cn.115985-20190328-00151

Inhibitory effect and biological mechanism of Dickkopf-1 on the proliferation of human lens epithelial cells

Zhang Limin, Bao Xiuli

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

Corresponding author: Bao Xiuli, Email: ophbaxili@hotmail.com

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Dickkopf-1 (DKK1) on the proliferation of human lens epithelial cells (LECs) and its possible mechanism in order to search a new target for the treatment of posterior capsular opacification (PCO). **Methods** Human LECs line (SRA 01/04 cells) were divided into Wnt3a overexpression group, DKK1 group and control group. Wnt3a gene expression vector was transfected into SRA 01/04 cells by liposome mediated transfection to establish a PCO model in the Wnt3a overexpression group, DKK1 of 100 μg/ml was added into the medium 48 hours after transfection of Wnt3a gene vector in the DKK1 group, and only pcDNA3-HA vector was transfected in the control group. The survival rate of SRA 01/04 cells was detected with a cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The expression rate of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the cells was detected by immunocytochemistry. The expression of β-catenin in the cells was detected and located by immunofluorescence. The expression of Wnt3a CyclinD1 and C-Myc were detected by Western blot assay. **Results** The relative expression of Wnt3a protein in the control group was 0.49 ± 0.07 , which was significantly lower than that

in the Wnt3a overexpression group (0.84 ± 0.06) ($t = 3.704, P = 0.02$). The survival rate in the Wnt3a overexpression group, DKK1 group and control group showed significant difference over time ($F_{group} = 10.910, P < 0.05; F_{time} = 6.041, P < 0.05$). The survival rate in the Wnt3a overexpression group was significantly increased in comparison with the control group and that in the DKK1 group was significantly reduced in comparison with the Wnt3a overexpression group (all at $P < 0.05$). β -Catenin was expressed mainly in cytoplasm and cell nucleus in the Wnt3a overexpression group and only in cytoplasm in the DKK1 group. In the control group, β -catenin showed a weakened expression in the cytoplasm and nucleus in comparison with the Wnt3a overexpression group. The expression rates of PCNA protein were ($9.4 \pm 1.4\%$), ($43.4 \pm 5.4\%$), and ($14.2 \pm 2.3\%$) in the control group, Wnt3a overexpression group and DKK1 group, respectively, with a significant difference among the groups ($F = 28.250, P < 0.05$), and the expression rates of PCNA protein were significantly reduced in the control group and DKK1 group compared with the Wnt3a overexpression group (both at $P < 0.05$). β -Catenin protein were expressed mainly in the cytoplasm and nucleus in the Wnt3a overexpression group and only in the cytoplasm in the control group. In the DKK1 group, the expression of β -catenin protein was weakened in the cytoplasm and nucleus in comparison with the Wnt3a overexpression group. The relative expressions of CyclinD1 were 0.64 ± 0.07 , 0.84 ± 0.03 and 0.55 ± 0.10 , C-Myc were 0.59 ± 0.05 , 0.93 ± 0.02 and 0.47 ± 0.08 in the control group, Wnt3a overexpression group and the DKK1 group, respectively with significant differences among the groups ($F = 20.580, 5.040$, both at $P < 0.05$). The relative expressions of CyclinD1 and C-Myc in the Wnt3a overexpression group were significantly higher than those in the DKK1 group and the control group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** DKK1 inhibits activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway induced by Wnt3a overexpression in SRA01/04 cells, and down-regulation of downstream target proteins cyclin D1 and C-Myc may be the biological mechanism of Dkk1 inhibiting human LECs proliferation.

[Key words] Dickkopf family; Lens epithelial cells; Wnt/ β -catenin signal pathway; Cell proliferation; Posterior capsular opacification

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81360145)

DOI: 10.3760/cma.j.cn.115985-20190328-00151

晶状体后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO) 是白内障囊外摘出术后常见的并发症, 术后残余晶状体前囊膜和赤道部晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 异常增生, 通过上皮间充质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 发生迁移和转化, 与细胞外基质聚积在晶状体囊袋形成纤维斑块, 发生后发性白内障, 导致视力下降^[1], 因此 LECs 增生和 EMT 的分子调控机制在 PCO 的形成中发挥重要作用, 是 PCO 治疗的靶点。在 PCO 发生和发展中, 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、Wnt、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和纤维母细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 等生物学信号通路的异常活化和相互作用可调控 LECs 的纤维化进程。经典 Wnt 通路, 即 Wnt/ β -catenin 通路的异常活化能够诱导人 LECs 异常增生, 发生 EMT^[2]。Wnt3a 蛋白与细胞膜的受体卷曲蛋白和低密度脂蛋白受体相关蛋白复合体 LRP5/6 结合后激活 G 蛋白蓬乱蛋白, 抑制糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 对 β -catenin 的磷酸化, 促进 β -catenin 的核转移, 与核转录因子 Tcf/Lef 结合, 激活下游靶基因启动基因转录^[3]。前期动物实验发现 Wnt 拮抗剂 DKK (Dickkopf) 分泌蛋白家族成员 DKK1 能有效抑制 PCO 形成, 抑制 LECs 发生 EMT^[4]。目前,

DKK1 对 LECs 增生的作用及其机制尚不清楚。本研究探讨 DKK1 对 LECs 增生的影响及其可能的调控机制, 为今后 PCO 的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人 LECs 系 SRA01/04 细胞株 (中国医学科学院肿瘤细胞库)。

1.1.2 主要试剂及仪器 DKK1 蛋白、MTT (美国 Sigma 公司); 人 Wnt3a 序列 PCR 扩增引物 (NM0033131, 上海生工生物工程公司); DMEM 培养液、胎牛血清 (bovine serum albumin, BSA) (美国 Gibco 公司); 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) (日本 DOJINDO 公司); 脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000、羊抗小鼠 IgG Alexa Flour488 (美国 Invitrogen 公司); SDS 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Pierce 公司); 小鼠抗人 Wnt3a 单克隆抗体 (ab81614, 1:1 000)、小鼠抗人 β -catenin 单克隆抗体 (1:1 000)、兔抗人 CyclinD1 单克隆抗体 (ab134175, 1:1 000)、兔抗人 C-Myc 单克隆抗体 (ab32072, 1:1 000)、羊抗小鼠二抗 (Alexa 594, sc-45101, 1:5 000)、兔抗人增生细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 多克隆抗体 (ab18197, 1:1 000)、小鼠抗人 β -actin

(sc-81178, 1:5 000)(美国 Santa cruz 公司); 化学发光 ECL 法(美国 Millipore 公司)。激光扫描共焦显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Wnt3a 过表达载体的构建 根据 GeneBank 数据库提供的人 Wnt3a (NM-033131) 序列设计合成带 Xho I/EcoR I 酶切位点的 Wnt-3a 的 PCR 扩增引物, 探针序列为: 正义引物 5'-AAAATCTAGAACACACCA ATGAAAAA-3', 反义引物 5'-GGGAATCCAAGAACATGT AAATGTCAT-3'(上海生工生物工程公司合成), 扩增产物片段为 1 076 bp。扩增产物与 pcDNA3-HA 载体同时 EcoR I 和 Xho I 双酶切, 回收酶切产物。经 T₄DNA 连接酶进行连接反应, 连接产物常规转化感受态细菌, 挑取阳性克隆, 碱裂解法提取表达载体, 经 EcoR I 和 Xho I 的双酶切鉴定及 DNA 测序鉴定, 得到 Wnt3a cDNA 表达载体。将 4 μg 构建的 Wnt3a cDNA 表达载体和 10 μl 脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 分别用 250 μl DMEM 稀释, 轻轻混匀, 室温下孵育 5 min 后混合孵育 20 min。

1.2.2 细胞分组及转染 将 SRA01/04 细胞株放入含体积分数 10% 牛血清蛋白的 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养。转染前 1 d, 将对数生长期的细胞以 4×10^5 孔的密度接种于 6 孔板内, 加入不含抗生素的 DMEM(含体积分数 15% 胎牛血清) 2 ml 进行培养。根据转染载体的不同将细胞分为 Wnt3a 过表达组、DKK1 组和对照组。Wnt3a cDNA 过表达组细胞用 Wnt3a cDNA 表达载体进行转染, 以建立 PCO 细胞模型; DKK1 组于细胞转染 Wnt3a cDNA 表达载体后 48 h 在细胞培养液中加入 100 μg/ml DKK1, 为保证培养液中 DKK1 的质量浓度, 每 24 小时加入 50 μg/ml DKK1, 48 h 后收集细胞做进一步分析测定; 对照组细胞转染无 Wnt3a cDNA 表达载体的 pcDNA 质粒。

1.2.3 CCK-8 检测各组细胞细胞活力 各组细胞经胰蛋白酶消化后接种至 5 个 96 孔板中, 细胞密度为 2 000 个/孔, 每种细胞每板种 18 个复孔, 分别培养 1、2、3、4 和 5 d 后, 每孔各加入 10 μl CCK-8 溶液, 37 °C 孵育 3 h, 酶标仪检测 450 nm 处吸光度(A)值。细胞存活率=各孔 A 值/该孔初始 A 值×100%, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.4 免疫组织化学法检测各组细胞 PCNA 蛋白阳性表达 各组细胞以 5×10^4 /ml 的密度提前铺于含有盖玻片的 12 孔盘中, 用质量分数 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 冲洗, 加入小鼠抗人单克隆 PCNA 抗体

4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗, 用羊抗小鼠二抗室温孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 封片。400 倍光学显微镜视野下每片任意选取 10 个视野, 计算阳性细胞数比例。以阳性细胞百分数代表 PCNA 蛋白阳性表达率。

1.2.5 免疫荧光法检测各组细胞中 β-catenin 表达 将各组细胞以 5×10^4 /ml 的密度提前铺于含盖玻片的 12 孔板中, 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 冲洗, 50 mmol/L 氯化铵猝灭游离多聚甲醛 10 min; PBS 冲洗, 0.5% sponin 室温处理 10 min; PBS 冲洗, 室温下 3% 牛血清蛋白封闭 1 h; PBS 冲洗, 加入小鼠抗人 β-catenin 单克隆抗体 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗 3 次, 加入羊抗小鼠 IgG Alexa Flour488 避光室温作用 1 h; PBS 洗 3 次, 加入 DAPI 染核, 避光室温作用 10 min; PBS 洗 2 次, 将盖玻片移至载玻片上, 用抗荧光衰减封片剂 mowiol 封片, 激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。

1.2.6 Western blot 法检测各组细胞中 Wnt3a、CyclinD1 和 C-Myc 蛋白的表达 在细胞中加入 1 倍 SDS 细胞裂解液。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 取 35 μg 样品行 SDS-PAGE, 电泳完毕后, 应用电转仪将样品移至 PVDF 膜, 质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入小鼠抗人 Wnt3a 单克隆抗体、兔抗人 CyclinD1 单克隆抗体和兔抗人 C-Myc 单克隆抗体一抗, 4 °C 孵育过夜, 洗膜后加入相应羊抗兔/小鼠二抗室温孵育 1 h, 洗膜后化学发光 ECL 法显影, 暗室曝光。以小鼠抗人 β-actin 作为内参。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件(美国 Chicago 公司, 序列号:4106532834)进行统计分析。本研究中测量指标的计量资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布, 以 mean±SD 表示, 组间数据资料经 Bartlett 检验证实方差齐。Wnt3a 过表达组、DKK1 组和对照组在不同时间点细胞增值值总体比较采用两因素方差分析, 各组细胞中 CyclinD1 和 C-Myc 相对表达量总体比较采用单因素方差分析, 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 Wnt3a 过表达组与对照组转染效率比较

Western blot 检测发现, Wnt3a 过表达组细胞中 Wnt3a 蛋白相对表达量为 0.84 ± 0.06 , 高于对照组的 0.49 ± 0.07 , 差异有统计学意义($t = 3.704, P = 0.02$) (图 1)。

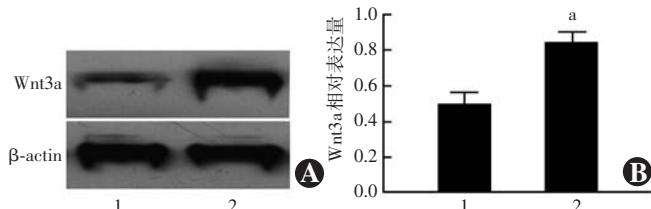


图 1 各组细胞中 Wnt3a 蛋白相对表达量比较 A: Western blot 法检测的电泳图 B: 各组细胞中 Wnt3a 蛋白表达的量化比较 与对照组比较,^a $P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 1: 对照组 2: Wnt3a 过表达组

Figure 1 Comparison of the relative expression of Wnt3a protein between the Wnt3a overexpression group and control group A: Western blot electrophoresis B: Comparison of Wnt3a protein relative expression between the Wnt3a overexpression group and control group Compared with the control group,^a $P < 0.05$ (independent sample t test, $n = 3$) 1:control group 2:Wnt3a overexpression group

2.2 各组细胞存活率比较

CCK-8 试验显示,对照组、Wnt3a 过表达组和 DKK1 组处理后不同时间点细胞生存率总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 10.910, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 6.041, P < 0.05$),其中 Wnt3a 过表达组第 3、4 和 5 天细胞生存率高于对照组,DKK1 组细胞生存率明显低于 Wnt3a 过表达组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 2,表 1)。

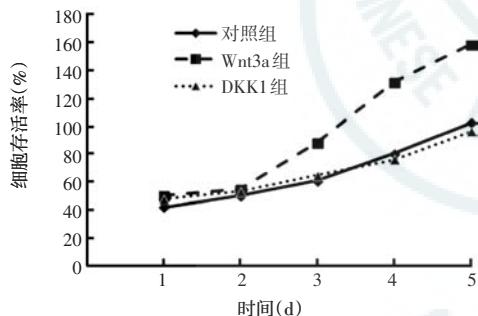


图 2 各组细胞不同时间点细胞存活率比较 DKK1:Dickkopf1
Figure 2 Comparison of cell survival rates at different time points among various groups DKK1:Dickkopf1

表 1 各组不同时点的细胞存活率比较 (mean±SD, %)

Table 1 Comparison of cell survival rates at different time among various groups (mean±SD, %)

组别	样本量	不同时点的细胞存活率				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
对照组	3	42±3	46±5	55±8	75±10	102±18
Wnt3a 过表达组	3	50±5	53±7	82±11 ^a	128±20 ^a	162±25 ^a
DKK1 组	3	48±5	50±6	59±9 ^b	69±10 ^b	96±14 ^b

注: $F_{\text{分组}} = 10.910, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 6.041, P < 0.05$; $F_{\text{交互作用}} = 19.586, P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-t 检验) 与各自时间点对照组比较,^a $P < 0.05$; 与各自时间点 Wnt3a 过表达组比较,^b $P < 0.05$

Note: $F_{\text{group}} = 10.910, P < 0.05$; $F_{\text{time}} = 6.041, P < 0.05$; $F_{\text{interaction}} = 19.586, P < 0.05$ (two-way ANOVA, LSD-t test) Compared with the control group at respective time point,^a $P < 0.05$; compared with the Wnt3a overexpression group,^b $P < 0.05$ (two-way ANOVA, LSD-t test)

2.3 各组细胞中 PCNA 表达比较

Wnt3a 过表达组细胞核中可见 PCNA 呈阳性表达,为棕黄色染色。DKK1 组细胞核中 PCNA 弱于 Wnt3a 过表达组,对照组细胞核中 PCNA 表达明显减弱(图 3)。对照组、Wnt3a 过表达组和 DKK1 组细胞中 PCNA 阳性表达率分别为 (9.4±1.4)%、(43.4±5.4)% 和 (14.2±2.3)% ,总体比较差异有统计学意义 ($F = 28.250, P = 0.001$), DKK1 组和对照组 PCNA 阳性表达率明显低于 Wnt3a 过表达组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

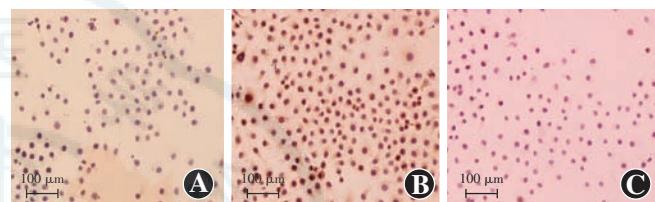


图 3 各组细胞中 PCNA 表达比较 (DAB × 400, 标尺 = 100 μm)

A:对照组可见少量 PCNA 阳性细胞,PCNA 表达于细胞核,呈棕黄色染色 B:Wnt3a 过表达组中大量 PCNA 阳性细胞表达 C:DKK1 组可见少量 PCNA 阳性细胞

Figure 3 Comparison of PCNA expression among various group (DAB × 400, bar = 100 μm) A: PCNA protein mainly expressed in nucleus with the brown-yellow staining. A few positive cells were seen in the control group B: A large number of PCNA positive cells were seen in the Wnt3a overexpression group C: PCNA positive cells were less in the DKK1 group

2.4 各组细胞中 β -catenin 蛋白表达比较

免疫荧光检测发现,Wnt3a 过表达组细胞中 β -catenin 蛋白主要表达于细胞质和细胞核,对照组细胞中 β -catenin 蛋白仅分布于细胞质,DKK1 组细胞中 β -catenin 蛋白主要分布于细胞质中,少量分布于细胞核(图 4)。

2.5 各组细胞中 C-Myc 和 CyclinD1 蛋白相对表达量比较

Western blot 检测显示,对照组、Wnt3a 过表达组和 DKK1 组细胞中 C-Myc 相对表达量分别为 0.59 ± 0.05 、 0.93 ± 0.02 和 0.47 ± 0.08 ,总体比较差异有统计学意义 ($F = 20.580, P < 0.05$),其中 Wnt3a 过表达组 C-Myc 相对表达量明显高于对照组和 DKK1 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。对照组、Wnt3a 过表达组和 DKK1 组细胞中 CyclinD1 相对表达量分别为 0.64 ± 0.07 、 0.84 ± 0.03 和 0.55 ± 0.10 ,总体比较差异有统计学意义 ($F = 5.040, P < 0.05$),其中 Wnt3a 过表达组 CyclinD1 相对表达量高于对照组和 DKK1 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图 5)。

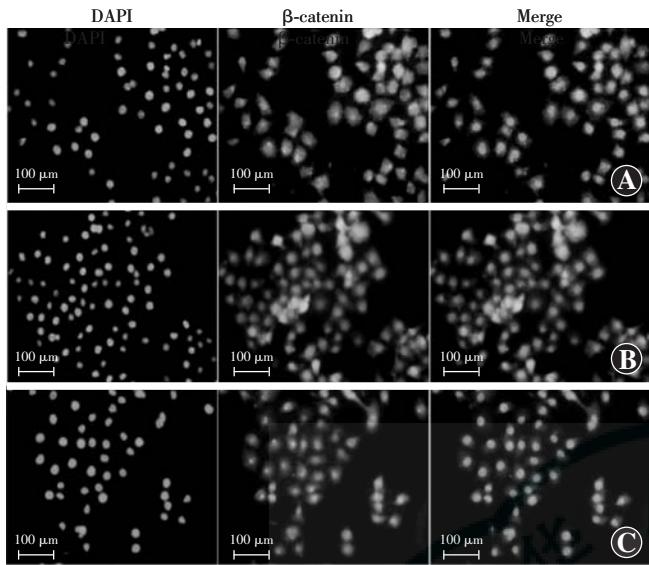


图 4 各组 SRA 01/04 细胞中 β -catenin 蛋白表达比较(标尺 = 100 μ m)
A: 对照组 β -catenin 蛋白仅分布在细胞质, 呈绿色荧光(Alexa Flour488), 细胞核呈蓝色荧光(DAPI); B: Wnt3a 过表达组 β -catenin 蛋白在细胞质和细胞核中均有大量表达; C: DKK1 组 β -catenin 蛋白多分布于细胞质, 少量分布于细胞核

Figure 4 Comparison of β -catenin expression among various groups
(bar = 100 μ m) A: β -catenin protein was only distributed in the cytoplasm in control group, showing a green fluorescence (Alexa Flour488), and cell nucleus showed the blue fluorescence (DAPI); B: β -catenin protein accumulated in the cytoplasm and nucleus in the Wnt3a overexpression group; C: β -catenin protein was mostly distributed in the cytoplasm and a small amount in the nucleus in the DKK1 group

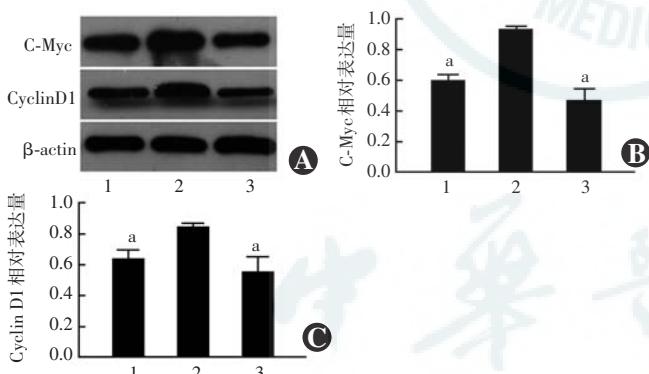


图 5 各组细胞中 C-Myc 和 CyclinD1 表达比较 A: Western blot 检测电泳图 B: 各组细胞中 C-Myc 表达强度的量化比较 与 Wnt3a 过表达组比较, $^aP < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-t 检验, $n = 3$) C: 各组细胞 CyclinD1 表达强度的量化比较 与 Wnt3a 过表达组比较, $^aP < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-t 检验, $n = 3$) 1: 对照组 2: Wnt3a 过表达组 3: DKK1 组

Figure 5 Comparison of relative expression of C-Myc and CyclinD1 protein among various groups A: Western blot electrophoresis among various groups B: Comparison of relative expression of C-Myc among various groups Compared with the Wnt3a overexpression group, $^aP < 0.05$ (one-way ANOVA, LSD-t test, $n = 3$) C: Comparison of relative expression of CyclinD1 among various groups Compared with the Wnt3a overexpression group, $^aP < 0.05$ (one-way ANOVA, LSD-t test, $n = 3$) 1: control group 2: Wnt3a overexpression group 3: DKK1 group

3 讨论

DKK1 作为高度保守的分泌型糖蛋白, 与生物体多种生物学功能有关, 参与纤维化进程的发生及进展, 在组织纤维化发生中发挥重要作用。胚眼内 DKK1 浓度对于胚眼中视裂闭合、角膜形成至关重要^[5]。DKK1 通过阻断胚眼角膜上皮细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路, 抑制角膜上皮来源的晶状体再生^[6], 在糖尿病视网膜病变患者血清中的 DKK1 含量明显降低^[7]。Zhou 等^[8]研究发现, DKK1 通过抑制视网膜色素上皮细胞中 β -catenin 和 CyclinD1 的表达, 能够抑制增生性视网膜病变的发生和发展。本研究中 CCK-8 试验显示, DKK1 组 SRA01/04 细胞转染后 48 h 细胞增生活性低于 Wnt3a 过表达组; 细胞免疫组织化学检测显示, 转染 Wnt3a 后 SRA0104 细胞核内 PCNA 蛋白表达升高, 而 DKK1 能够显著抑制其高表达。PCNA 是真核细胞 DNA 合成必需的细胞周期调节酸性核蛋白, 具有调控细胞复制和增生的作用, 其阳性表达程度代表细胞的增生能力。本研究表明, DKK1 可显著抑制晶状体上皮细胞增生活性。

研究发现, Wnt 信号参与白内障的形成^[9]。人角膜、晶状体、虹膜和视网膜组织中均存在 DKK1, 与组织的增生和修复相关^[6, 8, 10-11]。DKK1 在肝脏、小肠、关节等组织中能够特异性阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化^[12-13], 通过与低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein 5/6, LRP5/6) 结合, 抑制 Wnt 蛋白诱导的卷曲 LRP5/6 复合物形成, 发挥阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用。为进一步探讨 DKK1 对 LECs 增生作用的机制, 本研究中采取转染 Wnt3a 的方法, 特异性激活 LECs 中 Wnt/ β -catenin 信号通路^[14]。免疫荧光结果显示, DKK1 能有效阻断 LECs 中 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin 的核转移。作为经典 Wnt 信号通路的关键调控分子, β -catenin 突变或异常激活可导致多种细胞异常增生或凋亡^[15]。 β -Catenin 发生核转移和核积聚介导了 β -catenin/CBP 信号通路或 β -catenin/TCF 信号通路是 PCO 发生的关键, 其中 β -catenin/TCF 信号通路的核内靶基因 C-Myc 和 CyclinD1 与组织纤维化密切相关^[16-17]。本研究中通过 Western blot 法检测 LECs 中 C-Myc 和 CyclinD1 蛋白的表达, 发现 Wnt/ β -catenin 信号通路活化后引起 CyclinD1 和 C-Myc 表达增加, 而 DKK1 能够抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的核内靶基因 CyclinD1 和 C-Myc 的表达。C-Myc 是一种核磷酸蛋白, 也是一种刺激细胞周期进程的转录因子, CyclinD1

是细胞周期中 G₁ 期的主要调控蛋白,其过表达可使细胞 G₁ 期缩短,促进细胞发生 G₁/S 期转换,使休眠细胞进入分裂期,加速细胞有丝分裂,促进细胞增生^[18]。本研究中通过 Wnt3a 激活 LECs 中 Wnt/β-catenin 信号通路而促进 LECs 增生,但加入 Wnt 抑制剂 DKK1 后则抑制了 β-catenin 核转移及 β-catenin/TCF 信号通路下游靶基因 C-Myc 和 CyclinD1 的表达,说明 DKK1 通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路及其下游 β-catenin/TCF 信号通路的核内靶基因,抑制了 LECs 增生。在某些肿瘤组织中 DKK1 还可阻断 Wnt/JNK 等非经典 Wnt 信号通路,抑制细胞增生,诱导凋亡,说明 DKK1 是一个复杂的 Wnt 信号通路调节蛋白^[13,19]。DKK1 抑制 LECs 增生是否也通过对非经典 Wnt 信号通路的调控或与其他信号通路相互作用尚有待进一步研究。

综上所述,DKK1 通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路下调其核内靶基因 C-Myc 和 CyclinD1 的表达,可显著抑制 LECs 增生,揭示 DKK1 可能作为 PCO 基因预防和治疗的新靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] 刘含若,袁博伟,安莹,等.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[J].中华实验眼科杂志,2017,35(3):226-232. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.03.009.
- Liu HR, Yuan BW, An Y, et al. Inhibitory effect of autophagic tide stimulated by sulforaphane on cell proliferation in human lens capsule [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35 (3) : 226-232. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.03.009.
- [2] Lovicu FJ, Shin EH, McAvoy JW. Fibrosis in the lens. Sprouty regulation of TGF-β-signaling prevents lens EMT leading to cataract [J]. Exp Eye Res, 2016, 142 : 92-101. DOI:10.1016/j.exer.2015.02.004.
- [3] van Kappel EC, Maurice MM. Molecular regulation and pharmacological targeting of the β-catenin destruction complex [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174 (24) : 4575-4588. DOI:10.1111/bph.13922.
- [4] Liu T, Zhang L, Wang Y, et al. Dickkopf-1 inhibits Wnt-3a-induced migration and epithelial-mesenchymal transition of human lens epithelial cells[J]. Exp Eye Res, 2017, 161 : 43-51. DOI:10.106/j.exer.2017.06.001.
- [5] Lieven O, Ruther U. The Dkk1 dose is critical for eye development[J]. Dev Biol 2011, 355 (1) : 124-137. DOI:10.1016/j.ydbio.2011.04.023.
- [6] Hamilton PW, Sun Y, Henry JJ, et al. Lens regeneration from the cornea requires suppression of Wnt/β-catenin signaling [J]. Exp Eye Res, 2016, 145 : 206-215. DOI:10.1016/j.exer.2016.01.003.
- [7] Qiu F, He J, Zhou Y, et al. Plasma and vitreous fluid levels of Dickkopf-1 in patients with diabetic retinopathy[J]. Eye (Lond), 2014, 28 (4) : 402-409. DOI:10.1038/eye.2013.229.
- [8] Zhou J, Jiang J, Wang S, et al. DKK1 inhibits proliferation and migration in human retinal pigment epithelial cells via the Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2016, 12 (2) : 859-863. DOI:10.3892/etm.2016.3422.
- [9] Chong CC, Stump RJ, Lovicu FJ, et al. TGFbeta promotes Wnt expression during cataract development [J]. Exp Eye Res 2009, 88 (2) : 307-313. DOI:10.1016/j.exer.2008.07.018.
- [10] Benson MD, Khor CC, Gage PJ, et al. A targeted approach to genome-wide studies reveals new genetic associations with central corneal thickness[J]. Mol Vis, 2017, 23 : 952-962.
- [11] Hayashi T, Mizuno N, Takada R, et al. Determinative role of Wnt signals in dorsal iris-derived lens regeneration in newt eye [J]. Mech Dev, 2006, 123 (11) : 793-800. DOI:10.1016/j.mod.2006.08.009.
- [12] Katoh M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/β-catenin signaling activation (Review) [J]. Int J Mol Med, 2018, 42 (2) : 713-725. DOI:10.3892/ijmm.2018.3689.
- [13] Huang Y, Liu L, Liu A. Dickkopf-1: Current knowledge and related diseases[J]. Life Sci, 2018, 209 : 249-254. DOI:10.1016/j.lfs.2018.08.019.
- [14] Bao XL, Song H, Chen Z, et al. Wnt3a promotes epithelial-mesenchymal transition, migration, and proliferation of lens epithelial cells[J]. Mol Vis, 2012, 18 : 1983-1990. DOI:10.1186/1471-2199-13-24.
- [15] Prakash S, Swaminathan U. β-catenin in health: A review [J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2015, 19 (2) : 230-238. DOI:10.4103/0973-029X.164537.
- [16] Taiyab A, Korol A, Deschamps PA, et al. β-Catenin/CBP-dependent signaling regulates TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition of lens epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57 (13) : 5736-5747. DOI:10.1167/iovs.16-20162.
- [17] Cuevas CA, Tapia-Rojas C, Cespedes C, et al. Corrigendum to “β-Catenin-dependent signaling pathway contributes to renal fibrosis in hypertensive rats” [J/OL]. Biomed Res Int, 2016, 2016:9672429 [2019-11-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5075587/>. DOI:10.1155/2016/9672429.
- [18] Lian J, Tang J, Shi H, et al. Positive feedback loop of hepatoma-derived growth factor and β-catenin promotes carcinogenesis of colorectal cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6 (30) : 29357-29374. DOI:10.18632/oncotarget.4982.
- [19] Krause U, Ryan DM, Clough BH, et al. An unexpected role for a Wnt-inhibitor: Dickkopf-1 triggers a novel cancer survival mechanism through modulation of aldehyde-dehydrogenase-1 activity [J]. Cell Death Dis, 2014, 5 : 1093-1106. DOI:10.1038/cddis.2014.67.

(收稿日期:2019-03-28 修回日期:2020-03-15)

(本文编辑:杜娟)

读者·作者·编者

本刊对实验研究中动物使用方面的要求

为了提高实验研究论文中实验动物这个基础环节在国际上的认可度,本刊要求作者投稿时提供以下相应信息:(1)实验动物的种属、来源、一般信息及饲养条件;(2)实验动物的等级;(3)实验所遵循的相关实验动物保护条例或法规的具体名称以及颁布的机构名称。

(本刊编辑部)