

Src 家族酪氨酸蛋白激酶对高糖环境中人 LECs 凋亡及 EMT 的影响

刘蕊 周健 李宝海 陈媛媛 李东旭

【摘要】 背景 糖尿病性白内障是糖尿病的主要眼部并发症之一,包括皮质性、核性、囊膜下性及混合型白内障,其表型可能与晶状体上皮细胞(LECs)的不同病理改变有关,而糖尿病囊膜下性白内障是常见的表型之一。研究糖尿病囊膜下性白内障 LECs 的生物学行为对相关药物的研发和相关疾病的治疗有重要临床意义。目的 探讨 Src-家族酪氨酸蛋白激酶(SFKs)在高糖诱导的人 LECs 凋亡及上皮-间质转分化(EMT)中的作用。方法 将人 LECs 系 HLE-B3 细胞分为正常对照组、高糖组和 PP1 组,分别在含 5.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM、含 35.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 及含 35.5 mmol/L 葡萄糖+10 μ mol/L SFK 特异性抑制剂 PP1 的 DMEM 中培养 24 h。分别于细胞培养后 3、6、12 和 24 h 采用流式细胞术检测各组细胞的凋亡率;用倒置显微镜观察各组细胞的形态学变化;采用免疫荧光染色检测细胞中 EMT 标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的相对表达量;并用 Western blot 法检测 p-Src⁴¹⁸(活化的 c-Src 激酶)及凋亡相关蛋白 bcl-x1、survivin、caspase-3,EMT 相关蛋白 E-cadherin、 α -SMA 的表达变化。结果 高糖组人 LECs 中 p-Src⁴¹⁸ 的表达增高,并在培养 6 h 时达峰值,正常对照组、高糖组和 PP1 组人 LECs 中 p-Src⁴¹⁸ 的相对表达量(相对灰度值)分别为 0.042 \pm 0.011、0.125 \pm 0.036 和 0.035 \pm 0.018,正常对照组和 PP1 组人 LECs 中 p-Src⁴¹⁸ 的表达量明显低于高糖组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。细胞培养后 6、12 和 24 h,高糖组人 LECs 凋亡率稍高于正常对照组,但差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),PP1 组人 LECs 凋亡率分别为 (6.433 \pm 2.084)%、(10.333 \pm 2.610)% 和 (8.033 \pm 2.967)%,明显高于高糖组的 (3.233 \pm 1.320)%、(3.533 \pm 1.159)%、(5.733 \pm 0.230)% 及正常对照组的 (3.133 \pm 1.170)%、(2.833 \pm 0.751)%、(3.333 \pm 1.201)%,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),而高糖组与正常对照组间比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。细胞培养后 6 h 和 12 h,PP1 组细胞中凋亡抑制蛋白 bcl-x1、survivin 的相对表达量(相对灰度值)明显低于高糖组和正常对照组,而凋亡促进蛋白 caspase-3 的相对表达量明显高于高糖组和正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。高糖组培养后 24 h,LECs 呈梭形,发生纤维细胞样改变,PP1 组纤维样细胞减少。Western blot 法检测和免疫荧光染色均显示,培养后 6 h 高糖组细胞中 EMT 标志物 E-cadherin 蛋白的相对表达量低于 PP1 组和正常对照组,而 α -SMA 的相对表达量高于 PP1 组和正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 高糖环境可激活 LECs 中的 c-Src 激酶,进而诱导 LECs 发生 EMT,同时 LECs 的凋亡减少;用 PP1 抑制 c-Src 激酶的异常激活有助于维持高糖环境中 LECs 的上皮特性。

【关键词】 葡萄糖;人;晶状体上皮细胞;凋亡;Src 家族酪氨酸蛋白激酶;上皮-间质转分化;信号通路

Effects of activation of Src-family tyrosine kinases on human LECs apoptosis and EMT under the high glucose environment Liu Rui, Zhou Jian, Li Baohai, Chen Yuanyuan, Li Dongxu. Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Eye Institute of Chinese PLA, Xi'an 710032, China
Corresponding author: Zhou Jian, Email: zhoujian@fmmu.edu.cn

【Abstract】 **Background** Diabetic cataract is one of the major ocular complications in diabetes mellitus, including cortical cataract, nuclear cataract, subcapsular cataract and mixed cataract, and different cataractogenesis may be associated with lens epithelial cells (LECs). Subcapsular cataract is one of diabetic cataracts. Studying the biological behavior of LECs in subcapsular cataract is crucial for prevention and treatment. **Objective** This study was to investigate the effects of Src-family tyrosine kinases (SFKs) on apoptosis and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human LECs cultured by high glucose. **Methods** Human LECs (HLE-B3) were cultured for 24 hours with DMEM containing 5.5 mmol/L glucose (normal control group), DMEM containing 35.5 mmol/L glucose (high glucose group) and DMEM containing 35.5 mmol/L glucose + 10 μ mol/L PP1, a specific inhibitor of SFKs (PP1

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.06.002

基金项目:国家自然科学基金项目(81370998);陕西省科技统筹创新工程项目(2012KTCQ03-03)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所

通信作者:周健,Email:zhoujian@fmmu.edu.cn

group). In 3, 6, 12 and 24 hours after culture, the apoptosis of human LECs was detected by flow cytometry assay; morphological change of human LECs was observed under the inverted microscope, and the expressions of the markers of EMT, E-cadherin and α -smooth muscle actin (α -SMA), in the cells were detected by immunofluorescence staining. In addition, the alternations of p-Src⁴¹⁸ (active c-Src), bcl-xl, survivin, caspase-3, E-cadherin and α -SMA proteins were assayed by Western blot analysis. **Results** An elevated expression level of p-Src⁴¹⁸ was found in LECs in the high glucose group and peaked 6 hours after cultured. The expressions of p-Src⁴¹⁸ (grey levels) were 0.125 ± 0.036 in the high glucose group, and which was significantly higher than 0.042 ± 0.011 in the normal control group and 0.035 ± 0.018 in the PP1 group, respectively (both at $P < 0.01$). No remarkable differences were seen in the apoptotic rates between the high glucose group and normal control group in 6, 12 and 24 hours after culture (all at $P > 0.05$). The apoptotic rates of human LECs were $(6.433 \pm 2.084)\%$, $(10.333 \pm 2.610)\%$ and $(8.033 \pm 2.967)\%$ in the PP1 group, which were higher than $(3.233 \pm 1.320)\%$, $(3.533 \pm 1.159)\%$, $(5.733 \pm 0.230)\%$ in the high glucose group and $(3.133 \pm 1.170)\%$, $(2.833 \pm 0.751)\%$, $(3.333 \pm 1.201)\%$ in the normal control group (all at $P < 0.05$), however, there were significant differences in the apoptosis between the high glucose group and the normal control group (all at $P > 0.05$). In 6 hours and 12 hours after cell culture, the expression levels of bcl-xl and survivin (grey values) in human LECs were significantly declined, but the expression of caspase-3 was increased in the PP1 group compared with the high glucose group and the normal control group (all at $P < 0.05$). The LECs showed slender in shape 24 hours after culture in the high glucose group, but the cell shape was close to the normal in the PP1 group. Western blot and immunofluorescence assay revealed that the expression of E-cadherin in human LECs was significantly reduced and that of α -SMA was significantly increased 6 hours after culture in the high glucose group compared with the PP1 group and the normal control group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** High glucose activates c-Src kinase of LECs in high glucose environment and therefore induces EMT and inhibits apoptosis. However, PP1 impedes the biological process of EMT and apoptosis of LECs to maintain the epithelial characteristics even under the stress of high glucose.

[Key words] Glucose; Human; Epithelial cell, Lens; Apoptosis; Src-family tyrosine kinases; Epithelial-mesenchymal transition; Signaling pathway

晶状体囊膜下混浊是糖尿病性白内障的典型体征^[1],晶状体前后囊膜下出现异常的有核细胞及细胞外基质是囊膜下性白内障的主要病理特征^[2-3]。研究表明,晶状体前囊膜下混浊斑中的晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)可发生上皮-间质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),其主要诱导因素是炎症和转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)等^[4-5]。高浓度葡萄糖能否诱导 LECs 发生 EMT,参与糖尿病性白内障的发生是我们感兴趣的问题。在糖尿病大鼠白内障模型中,LECs 的凋亡是白内障发生的重要原因^[6],而细胞凋亡或 EMT 是细胞对外界刺激的反应,在机体的正常发育和维持自稳方面发挥重要作用。凋亡和 EMT 的改变或两者状态的失衡与一些病理过程相关^[7],但在糖尿病性白内障中这 2 种细胞生物学现象是否同时存在,以及哪些因素可能影响这 2 种生物学现象目前尚不清楚。Src 家族酪氨酸蛋白激酶(Src-family tyrosine kinases, SFKs)是膜结合的非受体酪氨酸蛋白激酶,在调控细胞的分化、凋亡和细胞信号转导等方面发挥重要作用^[8]。c-Src 激酶是 SFKs 成员之一,研究表明多种刺激因素均能引起 c-Src 激酶的激活,其异常的表达和活化与体内多种疾病,如晶状体混浊、上皮纤维化等密切相关^[9]。有研究表明,抑制 c-Src 的异常激活可抑

制实验性白内障的发生^[10-11]。本研究 c-Src 激酶在高浓度葡萄糖诱导的人 LECs 发生凋亡及 EMT 中的作用,探讨糖尿病囊膜下性白内障发生的细胞学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人 LECs 系 HLE-B3(北京市眼科研究所张炜研究员惠赠)。DMEM 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、质量分数 0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司); PP1(美国 Enzo 公司);兔抗人 p-Src⁴¹⁸(ab133460, 1:450)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)(ab133597, 1:800)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle action, α -SMA)抗体(ab32575, 1:800)(英国 Abcam 公司);兔抗人 c-Src(2123P, 1:700)、bcl-xl(54H6, 1:800)、survivin(71G4B7, 1:800)、caspase-3 抗体(8G10, 1:500)(美国 CST 公司);DAPI(美国 KPL 公司);山羊抗兔荧光二抗(美国 Invitrogen 公司);annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒(美国 BD 公司); β -actin(1:2000)、 β -tubulin(1:2000)(北京中杉金桥公司)。HF151 型 CO₂ 孵箱(上海力申科学仪器有限公司);BDS20 型光学倒置显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);DMI6000B 型倒置显微镜(德国莱卡公司);Model680 型酶标仪(美国 BIO RAD 公司);FV1000 型激光扫描

共焦显微镜(日本 Olympus 公司);XL 型流式细胞仪(美国贝克曼公司);Tanon 4200 型化学发光仪(上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 LECs 的培养 HLE-B3 细胞置于 25 cm² 的培养瓶内,培养基为含体积分数 10% FBS 的 DMEM (葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L),在 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 的孵箱内常规培养。当细胞生长至 70% ~ 80% 融合时进行传代,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 正常对照组细胞用含 5.5 mmol/L 葡萄糖和 0.5% FBS 的 DMEM 培养液进行培养,高糖组细胞用含 35.5 mmol/L 葡萄糖和 0.5% FBS 的 DMEM 培养液进行培养;PP1 组除加入与高糖组相同的细胞培养液外,还加入 SFK 特异性抑制剂 PP1,其终浓度为 10 μmol/L。

1.2.3 Western blot 法检测细胞中 p-Src⁴¹⁸、bcl-xl、survivin、活化的 caspase-3 的表达 取对数生长期的 HLE-B3 细胞,当细胞融合至 70% ~ 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化并重悬细胞,接种于 100 mm 培养皿中,常规培养 24 h 后更换为含 0.5% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h。按照不同的分组方法分别处理细胞 0、3、6、12 和 24 h,在冰上操作提取蛋白,用预冷的 PBS 清洗细胞,充分洗净培养液后向培养皿中加入 1 ml 预冷 PBS,用细胞刮收集细胞,然后用移液枪将刮下的细胞移入预冷离心管内,离心半径 7.2 cm,4 °C、1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,向离心管内加入 100 μl 细胞裂解液 [1 ml 裂解缓冲液含 10 μl 磷酸酶抑制剂、1 μl 蛋白酶抑制剂、5 μl 100 mmol/L 苯甲磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)],冰浴下裂解 30 min,每隔 5 分钟用细胞研磨器研磨,使细胞充分裂解。4 °C、14 000 r/min 离心 15 min,上清液内为所提取蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白液 40 μl,加入 10 μl 上样缓冲液,100 °C 煮沸 5 min,使蛋白充分变性,冷却至室温。0、3、6 h 各处理组蛋白样品和 0、12、24 h 各处理组蛋白样品分别在两板 SDS-PAGE 凝胶进行蛋白电泳分离,各蛋白样品上样量为 20 μg。用湿转法将蛋白电转移到硝酸纤维素膜上。取出硝酸纤维素膜,漂洗液(1 倍 TBST)漂洗 3 次,每次 5 min,用含质量分数 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液封闭 1 h,依据检测的目的蛋白添加相应一抗 1 000 μl,4 °C 孵育过夜,经 3 次洗涤后加入相应的二抗(1:2 000),室温下在摇床上 50 r/min 孵育 1 h,漂洗液洗膜 3 次,加入化学发光液,在化学发光仪上发光、成像并拍照。用 Image J 图像分析软件进行条带灰度值分析,以 β-actin 或 β-tubulin 作为内参,计算

并分析其相对灰度值。c-Src 的 Tyr418 位点磷酸化后,c-Src 激酶被激活,因此本研究检测 p-Src⁴¹⁸ 蛋白的表达量反映 c-Src 激酶的活化程度。所有实验均重复 3 次以上。

1.2.4 流式细胞仪检测人 LECs 凋亡率 取对数生长期的 HLE-B3 细胞,当细胞融合至 70% ~ 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化并重悬细胞,接种于 15 个 25 cm² 的培养瓶中,每瓶加入 0.5 ml 细胞悬液及 4.0 ml 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内常规培养 24 h,弃培养液,更换为含 0.5% FBS 的 DMEM 培养液,细胞同步化培养 24 h。将 15 瓶细胞每 3 瓶分为一组,弃培养液,按分组的不同分别处理细胞 0、3、6、12 和 24 h,分别将每瓶细胞的培养液收集于 15 ml 离心管,用 PBS 清洗细胞 1 次,加入不含 EDTA 的胰蛋白酶 1 ml 消化细胞,终止消化后分别收集于上述离心管中,离心半径 6.8 cm,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 2 ml PBS 重悬细胞,再次 1 000 r/min 离心 5 min。用移液器吸尽上清液,将细胞重悬于 100 μl 结合缓冲液中,再分别加入 5 μl annexin-V-FITC 及 10 μl PI,避光并置于冰上 30 min,转至流式检测管中,加入 400 μl 结合缓冲液,样品上机检测并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率 = 早期凋亡细胞百分比 + 晚期凋亡细胞百分比。

1.2.5 细胞形态观察 取对数生长期的 HLE-B3 细胞,当细胞融合至 70% ~ 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并重悬为单细胞悬液,接种于 6 孔板内,置于 37 °C、5% CO₂ 的孵箱内常规培养 24 h,弃培养液,更换为含 0.5% FBS 的 DMEM 培养液进行细胞同步化培养 24 h,之后每 3 孔为一组,按分组分别处理细胞 0、3、6、12、24 h,倒置显微镜下观察细胞形态并采集图像。

1.2.6 免疫荧光染色(ICC/IF)法观察 HLE-B3 中 E-cadherin 和 α-SMA 蛋白的表达 将 1 cm² 的爬片放置 24 孔板内,取对数生长期的 HLE-B3 细胞,当细胞融合至 70% ~ 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并重悬为单细胞悬液,细胞密度为 1 × 10⁴ /ml,每孔加入 500 μl 细胞悬液于爬片上,每孔内滴加含 10% FBS 的 DMEM 培养液 1.5 ml 培养细胞 24 h,更换为含 0.5% FBS 的 DMEM 培养基培养细胞 24 h,使细胞同步化,然后每 3 孔合并为一组,按上述分组方法分别处理细胞 6 h、12 h,取出细胞爬片,用 PBS 洗 3 次,洗净培养液,置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定 15 min,爬片晾干后用中性树胶固定于载玻片上,PBS 洗 3 次,体积分数 0.3% H₂O₂ 避光封闭 30 min,体积分数 0.3% Triton-X100 破膜 15 min,体积分数 50% 小牛血清室温下封闭 1 h。用兔抗人 E-cadherin(1:50)、α-SMA(1:50)一抗

孵育,4℃过夜,用山羊抗兔荧光二抗(1:500)在室温下避光孵育4h,经PBS漂洗后DAPI(1:1000)标记细胞核,再用体积分数50%甘油封片,在激光扫描共焦显微镜下观察细胞中E-cadherin和α-SMA蛋白的表达,并采集图像。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经W检验接近正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间经Levene检验证实方差齐。采用均衡分组三水平实验设计,Western blot法检测的蛋白相对表达量(相对灰度值)的差异比较均采用单因素方差分析,多重比较采用LSD-t检验。细胞培养后不同时间点正常对照组、高糖组和PP1组LECs细胞凋亡率的比较采用两因素方差分析,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 各组人LECs中p-Src⁴¹⁸相对表达量的比较

细胞处理后3、6、12和24h,高糖组人LECs中p-Src⁴¹⁸的相对表达量(相对灰度值)均高于同一时间点的正常对照组,培养后6h高糖组人LECs中p-Src⁴¹⁸的相对表达量最高,与同时时间点正常对照组比较差异有统计学意义($t=4.143, P=0.006$),各时间点PP1组人LECs中p-Src⁴¹⁸的相对表达量均降低,PP1作用后6h细胞中p-Src⁴¹⁸的相对表达量最低,与高糖组比较差异有统计学意义($t=-4.475, P=0.004$);与正常对照组各时间点相比,PP1组p-Src⁴¹⁸的相对表达量差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(图1,表1)。

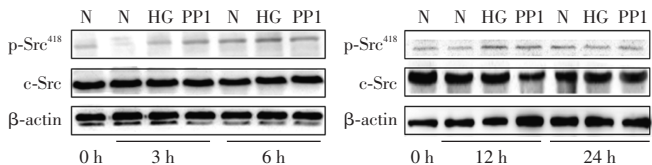


图1 Western blot法检测各组培养0、3、6、12、24h人LECs中c-Src激酶的表达 β-actin为内参照 N:正常对照组;HG:高糖组;PP1:PP1组

表1 各组不同时间点人LECs中p-Src⁴¹⁸相对表达量的比较($\bar{x}\pm s$,相对灰度值)

组别	样本量	不同时间点 p-Src ⁴¹⁸ 蛋白相对表达			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	3	0.054±0.021	0.042±0.011*	0.241±0.048	0.286±0.159
高糖组	3	0.069±0.005	0.125±0.036	0.447±0.186	0.329±0.215
PP1组	3	0.057±0.010	0.035±0.018*	0.408±0.178	0.311±0.092
F		0.934	12.436	3.270	1.033
P		0.443	0.007	0.110	0.412

注:与各自时间点高糖组比较,* $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD-t检测) LECs:晶状体上皮细胞

2.2 各组人LECs的凋亡率

不同处理组细胞培养后3、6、12和24h,高糖组和PP1组的细胞凋亡率逐渐增加,细胞凋亡率为3.2%~5.7%,相应时间点正常对照组细胞凋亡率为2.1%~3.3%,明显低于高糖组,但2个组间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);相应时间点PP1组细胞的凋亡率为3.5%~10.3%,培养后3h其细胞凋亡率与正常对照组和高糖组相近,组间比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);培养后6h,PP1组的细胞凋亡率明显高于正常对照组和高糖组,差异均有统计学意义($t=2.563, P=0.043$; $t=2.485, P=0.047$);细胞培养后12h,PP1组的细胞凋亡率仍明显高于正常对照组和高糖组,差异均有统计学意义($t=5.387, P=0.002$; $t=4.885, P=0.003$);细胞培养后24h,PP1组细胞凋亡率降低,但仍高于正常对照组,差异有统计学意义($t=3.112, P=0.021$),而与高糖组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。随着PP1作用时间的延长,PP1组细胞凋亡率出现了先逐渐增高后下降的趋势,培养后12h细胞的凋亡率最高,与3h的细胞凋亡率比较差异有统计学意义($t=3.732, P=0.006$),培养后24h细胞凋亡率虽较12h有所降低,但仍显著高于3h值,差异有统计学意义($t=2.474, P=0.038$)(图2,表2)。

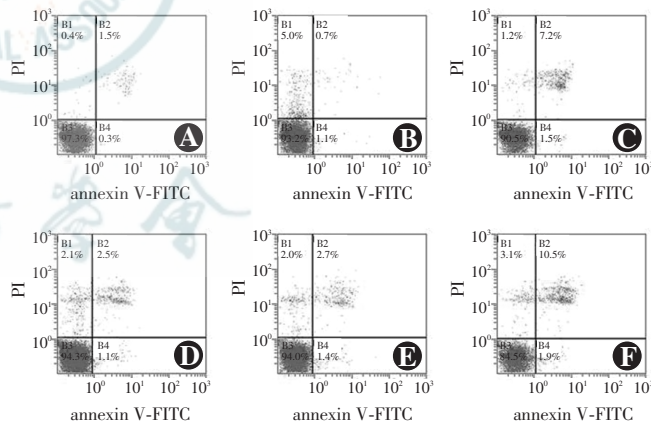


图2 流式细胞术检测各组细胞培养6h和12h时人LECs凋亡率的变化 细胞培养后6h和12h,PP1组细胞凋亡率均明显高于高糖组和正常对照组 A:正常对照组6h B:高糖组6h C:PP1组6h D:正常对照组12h E:高糖组12h F:PP1组12h

表2 各组不同时间点人LECs凋亡率的比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	样本量	不同时间点人LECs凋亡率			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	3	2.133±1.159	3.133±1.170	2.833±0.751	3.333±1.201
高糖组	3	3.667±0.231	3.233±1.320	3.533±1.159	5.733±0.230
PP1组	3	3.500±0.435	6.433±2.084 ^{ab}	10.333±2.610 ^{abc}	8.033±2.967 ^{ac}

注:F_{分组}=21.382, $P<0.01$;F_{时间}=11.523, $P<0.01$ 。与各自时间点正常对照组比较,* $P<0.05$;与各自时间点高糖组比较,^b $P<0.05$;与各自组内3h值比较,^c $P<0.05$ (两因素方差分析,LSD-t检测) LECs:晶状体上皮细胞

2.3 各组人 LECs 中凋亡相关蛋白的表达

高糖组细胞培养各时间点 LECs 中凋亡抑制蛋白 bcl-xl 蛋白的相对表达量高于正常对照组,但差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),PP1 组细胞中 bcl-xl 的相对表达量均明显低于正常对照组和高糖组,培养后 6 h 和 12 h,PP1 组 bcl-xl 蛋白的相对表达量明显低于正常对照组和高糖组,差异均有统计学意义(6 h: $t = -3.372, P = 0.015$; $t = -2.855, P = 0.029$; 12 h: $t = -3.519, P = 0.013$; $t = -2.722, P = 0.035$) (图 3, 表 3)。

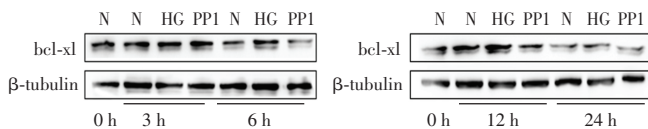


图 3 Western blot 法检测各组培养 0、3、6、12、24 h 人 LECs 中 bcl-xl 的表达 β -tubulin 为内参照 N: 正常对照组; HG: 高糖组; PP1: PP1 组

表 3 各组不同时间点人 LECs 中 bcl-xl 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$, 相对灰度值)

组别	样本量	不同时间点 bcl-xl 蛋白相对表达量			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	3	0.791±0.189	0.665±0.219	0.973±0.281	0.587±0.152
高糖组	3	0.857±0.223	0.874±0.196	1.081±0.183	0.628±0.109
PP1 组	3	0.714±0.144	0.406±0.184 ^{ab}	0.641±0.066 ^{ab}	0.530±0.123
F		0.443	6.599	6.812	0.451
P		0.667	0.031	0.029	0.657

注:与各自时间点的正常对照组比较,^a $P<0.05$;与各自时间点的高糖组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) LECs:晶状体上皮细胞

Western blot 法检测发现,凋亡抑制蛋白 survivin 的表达趋势与 bcl-xl 的相似,在各时间点高糖组细胞中 survivin 的相对表达量较正常对照组略高,但差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);PP1 组细胞中 survivin 的相对表达量均低于正常对照组和高糖组,培养 6 h 和 12 h 时 PP1 组细胞中 survivin 的相对表达量均明显低于正常对照组和高糖组,差异均有统计学意义(6 h: $t = -8.636, P = 0.000$; $t = -10.062, P = 0.000$; 12 h: $t = -2.680, P = 0.037$; $t = -4.057, P = 0.007$) (图 4, 表 4)。

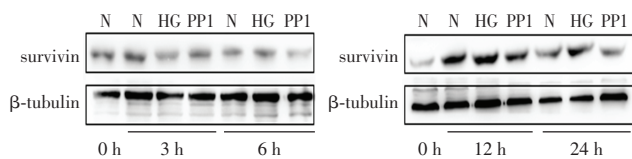


图 4 Western blot 法检测各组培养 0、3、6、12、24 h 人 LECs 中 survivin 的表达 β -tubulin 为内参照 N: 正常对照组; HG: 高糖组; PP1: PP1 组

表 4 各组不同时间点人 LECs 中 survivin 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$, 相对灰度值)

组别	样本量	不同时间点 survivin 蛋白相对表达量			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	3	0.497±0.511	0.487±0.461	1.170±0.277	0.641±0.107
高糖组	3	0.449±0.036	0.571±0.421	1.212±0.276	0.714±0.186
PP1 组	3	0.412±0.050	0.188±0.038 ^{ab}	0.874±0.152 ^{ab}	0.624±0.133
F		2.521	59.292	8.514	0.210
P		0.160	0.000	0.018	0.979

注:与各自时间点的正常对照组比较,^a $P<0.05$;与各自时间点的高糖组比较,^b $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) LECs:晶状体上皮细胞

Western blot 法检测促凋亡蛋白 caspase-3 蛋白的表达发现,细胞培养后 3 h 和 6 h,高糖组细胞中活化的 caspase-3 的相对表达量与正常对照组接近,培养后 12 h 和 24 h 细胞中活化的 caspase-3 相对表达量稍高于正常对照组,但差异均无统计学意义(12 h: $t = 1.121, P = 0.305$; 24 h: $t = 1.309, P = 0.238$),PP1 组细胞中活化的 caspase-3 的相对表达量升高,培养后 6 h 和 12 h,PP1 组细胞中活化的 caspase-3 蛋白的相对表达量明显高于正常对照组和高糖组,差异均有统计学意义(6 h: $t = 5.197, P = 0.025$; $t = 4.172, P = 0.037$; 12 h: $t = 7.200, P = 0.000$; $t = 6.079, P = 0.001$) (图 5, 表 5)。

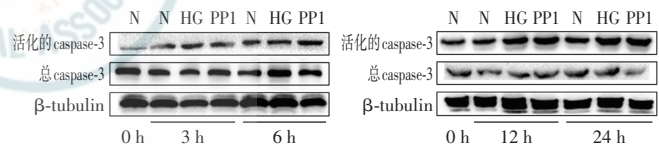


图 5 Western blot 法检测各组培养 0、3、6、12、24 h 人 LECs 中活化的 caspase-3 和总 caspase-3 的表达 β -tubulin 为内参照 N: 正常对照组; HG: 高糖组; PP1: PP1 组

表 5 各组不同时间点人 LECs 中活化的 caspase-3 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$, 相对灰度值)

组别	样本量	不同时间点活化的 caspase-3 蛋白相对表达量			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	3	0.994±0.244	1.135±0.238	1.087±0.261	1.680±0.577
高糖组	3	1.199±0.313	1.240±0.254	2.092±0.251	2.127±0.348
PP1 组	3	1.204±0.220	2.183±0.297 ^{ab}	3.260±0.527 ^{ab}	2.786±0.262
F		0.682	14.251	30.024	4.816
P		0.565	0.005	0.001	0.053

注:与各自时间点的正常对照组比较,^a $P<0.05$;与各自时间点的高糖组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) LECs:晶状体上皮细胞

2.4 各组人 LECs 的形态改变

倒置显微镜下观察发现,与正常对照组相比,高糖组 LECs 逐渐失去原有细胞表型,细胞皱缩、变长,向纤维细胞的形态转变;PP1 组 LECs 皱缩、变长的程度较高糖组减轻,在 6 h 和 12 h 时的变化较为明显(图 6)。

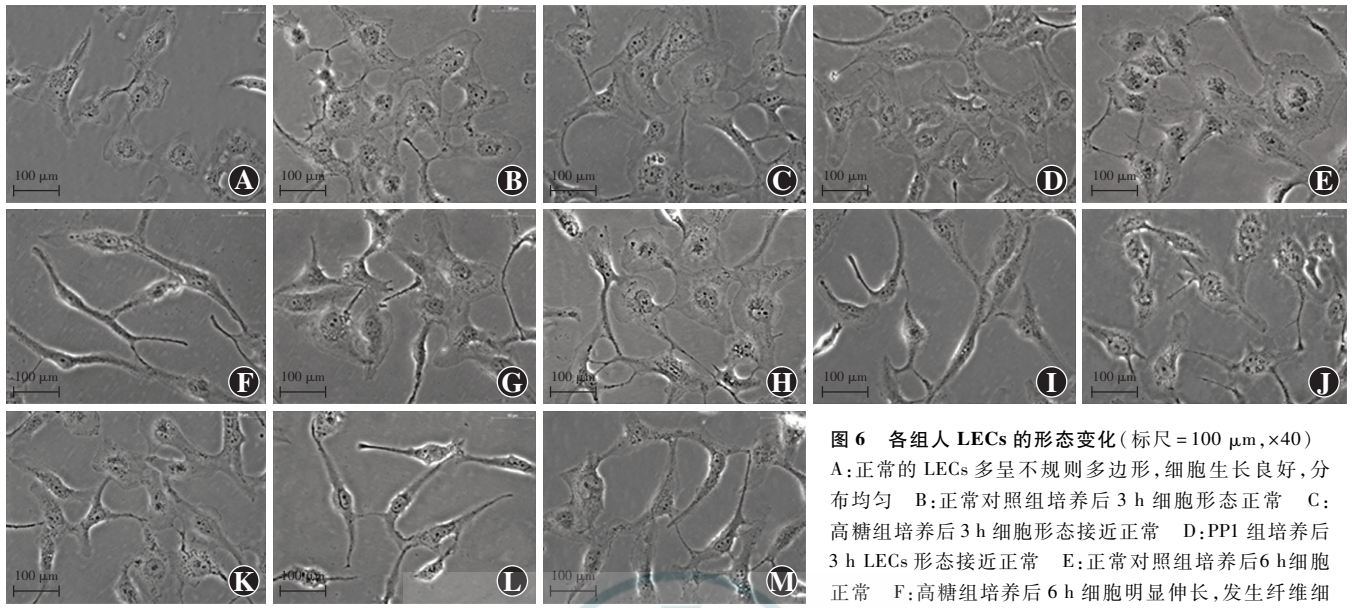


图 6 各组人 LECs 的形态变化 (标尺 = 100 μm, ×40)

A: 正常的 LECs 多呈不规则多边形, 细胞生长良好, 分布均匀 B: 正常对照组培养后 3 h 细胞形态正常 C: 高糖组培养后 3 h 细胞形态接近正常 D: PP1 组培养后 3 h LECs 形态接近正常 E: 正常对照组培养后 6 h 细胞正常 F: 高糖组培养后 6 h 细胞明显伸长, 发生纤维细胞样改变 G: PP1 组培养后 6 h 细胞形态与正常对照组接近 H: 正常对照组培养后 12 h 细胞形态正常 I: 高糖组培养后 12 h 细胞呈梭形, 多边形细胞极少 J: PP1 组培养后 12 h 细胞形态与正常对照组接近 K: 正常对照组培养后 24 h 细胞形态尚可 L: 高糖组培养后 24 h 细胞呈梭形 M: PP1 组培养后 24 h 细胞逐渐变为长梭形

2.5 各组人 LECs 中 EMT 标志蛋白 E-cadherin 和 α-SMA 蛋白的相对表达

Western blot 法检测发现, 细胞培养后 3 h 正常对照组、高糖组和 PP1 组细胞中 E-cadherin 的相对表达量相近, 差异无统计学意义 ($F = 0.091, P = 0.914$); 细胞培养后 6 h, 高糖组细胞中 E-cadherin 的相对表达量较正常对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($t = -2.616, P = 0.021$), 而 PP1 组细胞中 E-cadherin 的相对表达量与正常对照组接近, 且明显高于高糖组 ($t = 2.484, P = 0.043$); 培养后 12 h 和 24 h, 高糖组细胞中 E-cadherin 的相对表达量略低于正常对照组和 PP1 组, 正常对照组和 PP1 组间表达相近, 但各组间的差异均无统计学意义 ($F = 2.894, P = 0.132; F = 0.192, P = 0.830$) (图 7, 表 6)。

免疫荧光染色法观察发现, 高糖组细胞培养后 6 h 和 12 h, LECs 中 E-cadherin 表达的荧光强度较正常对照组明显降低, PP1 组 E-cadherin 表达的荧光强度强于高糖组, 而与正常对照组荧光强度相似 (图 8)。

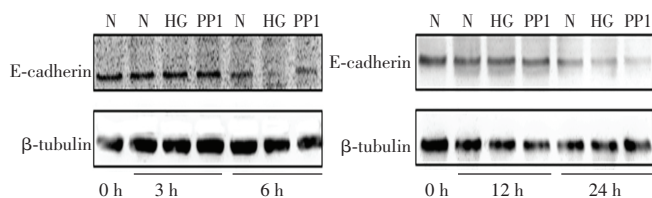


图 7 Western blot 法检测各组培养后 0、3、6、12、24 h 人 LECs 中 E-cadherin 的相对表达 β-tubulin 为内参照 N: 正常对照组; HG: 高糖组; PP1: PP1 组 E-cadherin: E-钙黏蛋白

表 6 各组不同时间点人 LECs 中 E-cadherin 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$, 相对灰度值)

组别	样本量	各时间点 E-cadherin 蛋白相对表达量			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	3	0.699±0.214	0.549±0.246 ^a	0.497±0.035	0.131±0.023
高糖组	3	0.635±0.217	0.120±0.408	0.424±0.025	0.120±0.035
PP1 组	3	0.632±0.223	0.473±0.155 ^a	0.463±0.023	0.114±0.039
F		0.091	5.465	2.894	0.192
P		0.914	0.045	0.132	0.830

注: 与各自的高糖组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-t 检验)

LECs: 晶状体上皮细胞; E-cadherin: E-钙黏蛋白

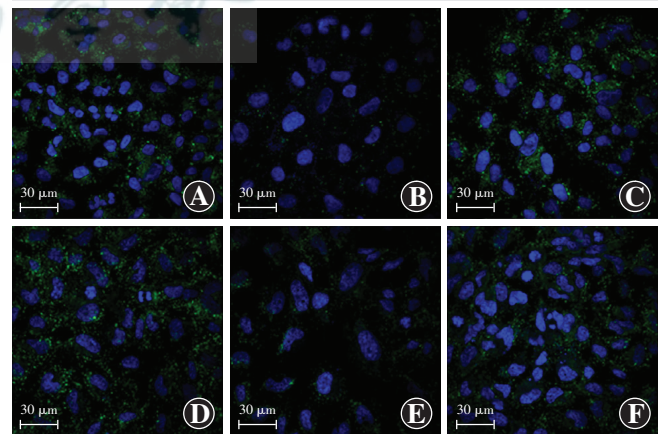


图 8 免疫荧光染色法检测各组人 LECs 中 E-cadherin 的表达 (ICC/IF, 标尺 = 30 μm)

A: 正常对照组培养后 6 h 表达 E-cadherin 的细胞数量较多, 呈绿色荧光, 细胞核呈蓝色荧光 B: 高糖组培养后 6 h 细胞中 E-cadherin 的表达强度减弱 C: PP1 组培养后 6 h 细胞中 E-cadherin 表达的荧光强度强于高糖组, 与正常对照组相近 D: 正常对照组培养后 12 h 细胞中 E-cadherin 呈绿色荧光, 数量多 E: 高糖组培养后 12 h 细胞中 E-cadherin 的绿色荧光强度较正常对照组明显减弱 F: PP1 组培养后 12 h 细胞中 E-cadherin 的荧光强度较高糖组明显增强, 与正常对照组相近

Western blot 法检测发现,细胞培养后 3 h 正常对照组、高糖组和 PP1 组细胞中 α -SMA 的相对表达量接近,差异无统计学意义 ($F=0.458, P=0.653$); 培养后 6 h 高糖组细胞中 α -SMA 的相对表达量较正常对照组增高,差异有统计学意义 ($t=3.368, P=0.015$), 而 PP1 组细胞中 α -SMA 的相对表达量与正常对照组接近,且明显低于高糖组,差异有统计学意义 ($t=-2.590, P=0.041$); 培养后 12 h 和 24 h 时,高糖组细胞中 α -SMA 的相对表达量仍高于正常对照组,PP1 组的相对表达量较高糖组下降而与正常对照组相近,但 3 个组间差异均无统计学意义 ($F=1.017, P=0.417$; $F=0.639, P=0.560$) (图 9, 表 7)。

LECs 中 α -SMA 荧光染色结果显示,在培养后 6 h 和 12 h,高糖组细胞中 α -SMA 的荧光强度明显强于正常对照组,而 PP1 组的荧光强度明显弱于高糖组,与正常对照组荧光强度接近 (图 10)。

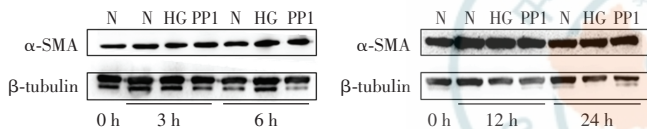


图 9 Western blot 法检测各组培养后 0、3、6、12、24 h 人 LECs 中 α -SMA 的表达 β -tubulin 为内参照 N: 正常对照组; HG: 高糖组; PP1: PP1 组 SMA: 平滑肌肌动蛋白

表 7 各组不同时间点人 LECs 中 α -SMA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$, 相对灰度值)

组别	样本量	不同时间点 α -SMA 蛋白相对表达量			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	3	0.818±0.583	0.793±0.188 ^a	1.707±0.564	1.829±0.232
高糖组	3	1.194±0.645	2.436±0.957	2.397±0.909	1.957±0.214
PP1 组	3	1.148±0.577	1.186±0.443 ^a	1.962±0.555	1.728±0.293
F		0.458	6.220	1.017	0.639
P		0.653	0.034	0.417	0.560

注:与各自的正常对照组比较, ^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) LECs: 晶状体上皮细胞; SMA: 平滑肌肌动蛋白

3 讨论

糖尿病性白内障依据临床表现分为皮质性、核性、囊膜下性及混合型。对白内障的病理学研究发现,皮质性白内障发生 LECs 水肿和晶状体纤维的损坏^[12],核性白内障可见 LECs 密度降低和细胞损伤^[13],而后囊膜下性白内障则是在后囊膜下存在大量有核细胞和细胞外基质,提示 LECs 的不同病理改变可能与白内障的表型有关。研究显示,糖尿病皮质性白内障患者 LECs 发生凋亡^[14],在大鼠糖尿病模型中也发现晶状体纤维的肿胀及皮质内空泡和裂隙的形成,并迅速发

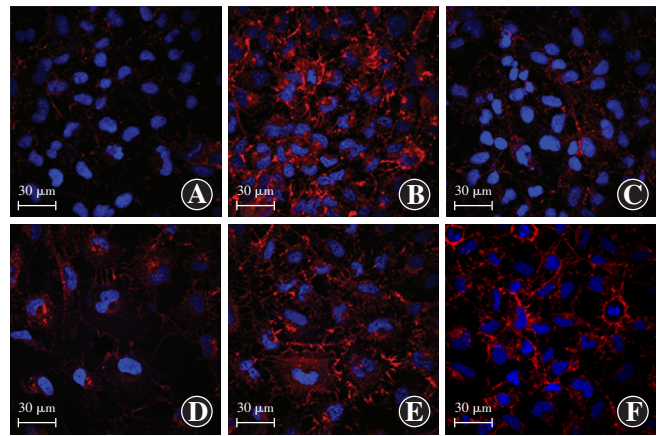


图 10 各组人 LECs 中 α -SMA 蛋白的表达 (ICC/IF, 标尺=30 μ m) A: 正常对照组培养后 6 h 细胞中 α -SMA 表达微弱,呈红色荧光,阳性细胞少,细胞核呈蓝色荧光 B: 高糖组培养后 6 h 细胞中 α -SMA 表达强,阳性细胞明显增加 C: PP1 组培养后 6 h, α -SMA 阳性细胞数量较高糖组减少,荧光强度减弱 D: 正常对照组培养后 12 h α -SMA 阳性细胞荧光强度较弱,阳性细胞数量少 E: 高糖组培养后 12 h α -SMA 阳性细胞数量较正常对照组明显增加,荧光增强 F: PP1 组培养后 12 h α -SMA 阳性细胞数量较高糖组减少,荧光强度减弱

生全晶状体混浊^[12,15], LECs 凋亡显著增加^[6]。

实际上,高糖刺激还可诱导 LECs 发生凋亡以外的其他病理改变。本研究发现,单纯的高浓度葡萄糖培养细胞后并未导致人 LECs 凋亡率的显著升高,而且抑制凋亡的 bcl-xl 蛋白和 survivin 蛋白以及促凋亡的 caspase-3 蛋白的表达量也未见显著变化,但 EMT 标志物 E-cadherin 表达减弱, α -SMA 表达增高,提示高糖诱导了细胞的转分化过程,这种变化可能是糖尿病患者易发生囊膜下性白内障的重要因素。

在高浓度葡萄糖诱导 LECs 发生 EMT 的过程中, c-Src 作为关键分子发挥重要作用。本研究显示,高浓度葡萄糖激活 c-Src 酪氨酸蛋白激酶后,单次使用 10 μ mol/L PP1 可抑制 c-Src 激酶的活性,以 PP1 作用后 6 h 更为明显,可能与 PP1 的半抑制浓度有关。一些学者研究高浓度葡萄糖对视网膜血管内皮细胞的影响时发现,高糖可激活 Src 激酶^[16-17],也有研究发现高糖激活肾小球系膜细胞 Src 激酶,诱导细胞基质蛋白的累积,PP1 可明显抑制这种变化^[18],这些结果与本研究结果一致。

本研究中发现,用 PP1 抑制 c-Src 激酶的活性后,抑制凋亡蛋白 bcl-xl 和 survivin 的表达减弱,促凋亡蛋白 caspase-3 的表达量增加,细胞向凋亡的方向转化,凋亡细胞百分比增加,不仅如此,PP1 还抑制了高糖诱导的 LECs 发生 EMT,这说明高浓度葡萄糖诱导的 LECs 变化中,活化的 c-Src 一方面抑制了 LECs 的凋亡,另一方面促使细胞发生 EMT,参与细胞凋亡和 EMT 过程的调节。已有研究表明,Src 参与细胞生存

的调节,活化的 Src 激酶在渥曼青霉素阻断剂诱导的 HIN3T3 细胞凋亡中起抗凋亡作用^[19]。Lluis 等^[20]研究发现,缺氧诱导肝癌细胞、神经母细胞瘤细胞和结肠癌细胞的 c-Src 激酶活化,活化的 c-Src 激酶通过刺激核因子- κ B 信号途径抵抗细胞凋亡;Almeida 等^[21]的研究也证实,活化的 Src 激酶可通过 Src/ERK 和 P13K/Akt 信号级联反应抵抗成骨细胞凋亡;Src 激酶通过对凋亡的影响使乳腺肿瘤细胞更容易获得 EMT 的表型^[22],这些结果与本研究结果一致,利用 c-Src 激酶这个靶点可能调节细胞的凋亡和 EMT。

综上所述,本研究发现高浓度葡萄糖能够激活 LECs 内的 c-Src 激酶,后者抑制细胞凋亡,并诱导细胞发生 EMT,这一过程可能在糖尿病囊膜下性白内障的形成中发挥重要作用。PP1 抑制 c-Src 激酶的异常激活对维持 LECs 的特性,进而维持高糖环境下晶状体的内环境稳定及透明性有重要作用。

参考文献

- [1] Chen SJ, Liu JH, Shih HC, et al. Prevalence and associated factors of lens opacities among Chinese type 2 diabetics in Kinmen, Taiwan [J]. *Acta Diabetol*, 2008, 45 (1) : 7-13. doi:10.1007/s00592-007-0012-9.
- [2] Creighton MO, Trevithick JR, Mousa GY, et al. Globular bodies: a primary cause of the opacity in senile and diabetic posterior cortical subcapsular cataracts? [J]. *Can J Ophthalmol*, 1978, 13(3) : 166-181.
- [3] Eshagian J. Human posterior subcapsular cataract [J]. *Trans Ophthalmol Soc UK*, 1983, 102 pt 3 : 364-368.
- [4] Hales AM, Chamberlain CG, Mcavoy JW. Cataract induction in lenses cultured with transforming growth factor-beta [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36(8) : 1709-1713.
- [5] Zablocki GJ, Ruzycski PA, Overturf MA, et al. Aldose reductase-mediated induction of epithelium-to-mesenchymal transition (EMT) in lens [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 191 (1-3) : 351-356. doi:10.1016/j.cbi.2011.02.005.
- [6] Mulhern ML, Madson CJ, Danford A, et al. The unfolded protein response in lens epithelial cells from galactosemic rat lenses [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(9) : 3951-3959.
- [7] Song J. EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta [J]. *Cell Res*, 2007, 17(4) : 289-290. doi:10.1038/cr.2007.25.
- [8] Amata I, Maffei M, Pons M. Phosphorylation of unique domains of Src family kinases [J/OL]. *Front Genet*, 2014, 5 : 181 [2014-12-13]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2014.00181/full>. doi:10.3389/fgene.2014.00181.
- [9] Aleshin A, Finn RS. SRC: a century of science brought to the clinic [J]. *Neoplasia*, 2010, 12(8) : 599-607.
- [10] Zhou J, Menko AS. The role of Src family kinases in cortical cataract formation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(7) : 2293-2300.
- [11] Zhou J, Leonard M, Van Bockstaele E, et al. Mechanism of Src kinase induction of cortical cataract following exposure to stress: destabilization of cell-cell junctions [J]. *Mol Vis*, 2007, 13 : 1298-1310.
- [12] Obrosova IG, Chung SS, Kador PF. Diabetic cataracts: mechanisms and management [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2010, 26(3) : 172-180. doi:10.1002/dmrr.1075.
- [13] Klein BE, Klein R, Moss SE. Prevalence of cataracts in a population-based study of persons with diabetes mellitus [J]. *Ophthalmology*, 1985, 92(9) : 1191-1196.
- [14] Jung Y, Kim MS, Joo CK, et al. Role of the intrinsic apoptotic pathway in cataractogenesis in type 2 diabetic patients [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2013, 39(10) : 1470-1476. doi:10.1016/j.jcrs.2013.03.036.
- [15] Kinoshita JH. A thirty year journey in the polyol pathway [J]. *Exp Eye Res*, 1990, 50(6) : 567-573.
- [16] Huang Q, Sheibani N. High glucose promotes retinal endothelial cell migration through activation of Src, PI3K/Akt1/eNOS, and ERKs [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295(6) : C1647-C1657. doi:10.1152/ajpcell.00322.2008.
- [17] Chen X, Li J, Li M, et al. KH902 suppresses high glucose-induced migration and sprouting of human retinal endothelial cells by blocking VEGF and PIGF [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15(3) : 224-233. doi:10.1111/dom.12008.
- [18] Taniguchi K, Xia L, Goldberg HJ, et al. Inhibition of Src kinase blocks high glucose-induced EGFR transactivation and collagen synthesis in mesangial cells and prevents diabetic nephropathy in mice [J]. *Diabetes*, 2013, 62(11) : 3874-3886. doi:10.2337/db12-1010.
- [19] Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, et al. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(8) : 4442-4453.
- [20] Lluis JM, Buricchi F, Chiarugi P, et al. Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- κ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(15) : 7368-7377. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0515.
- [21] Almeida M, Han L, Bellido T, et al. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(50) : 41342-41351. doi:10.1074/jbc.M502168200.
- [22] Ai M, Liang K, Lu Y, et al. Brk/PTK6 cooperates with HER2 and Src in regulating breast cancer cell survival and epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(3) : 237-245. doi:10.4161/cbt.23295.

(收稿日期:2015-01-09)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~5 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组,中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用,但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释顺表》还原为全称,各关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)