

Rho 激酶抑制剂盐酸法舒地尔对人 LECs 增生、迁移及 ECM 合成的抑制作用

任师杰 张凤妍 祁颖 崔琨明

【摘要】 背景 白内障囊外摘出术后晶状体囊残留的晶状体上皮细胞(LECs)的生物学行为改变是后发性白内障的主要病理改变。Rho 激酶抑制剂盐酸法舒地尔具有抑制细胞骨架的重构、迁移、黏附及纤维化等作用,但对 LECs 的作用尚不清楚。目的 探讨盐酸法舒地尔对人 LECs 株 HLEB-3 细胞增生、迁移的作用及其对细胞外基质(ECM)合成的影响。方法 常规培养 HLEB-3 细胞,对照组细胞仍进行常规培养,药物组培养液中加入不同浓度的盐酸法舒地尔,使其终浓度分别为 10、20、40 和 60 $\mu\text{mol/L}$,分别于培养后 12、24 和 48 h 采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法检测各组细胞的增生情况,计算不同剂量盐酸法舒地尔对细胞增生的抑制率;分别于处理后 12、24、36 和 48 h 采用 Transwell 小室迁移实验检测各组的迁移细胞数;并于上述时间点采用 ELISA 法检测各组细胞上清中 I 型胶原(COL-I)、纤维连接蛋白(FN)的质量浓度及细胞内 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)质量浓度,对各组间的检测结果进行比较。结果 不同浓度盐酸法舒地尔组 HLEB-3 细胞增生抑制率均明显高于对照组,随着盐酸法舒地尔浓度的增加,HLEB-3 细胞增生抑制率明显增加,组间总体差异有统计学意义($F_{\text{浓度}} = 966.727, P = 0.000$);随着盐酸法舒地尔作用时间的延长,HLEB-3 细胞增生抑制率明显增加,总体比较差异有统计学意义($F_{\text{时间}} = 280.428, P = 0.000$)。Transwell 小室迁移实验显示,实验后 48 h,对照组穿过聚碳酸酯膜的细胞数为 (29.20 ± 1.28) 个,10、20、40 和 60 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组迁移的细胞数分别为 (24.40 ± 1.33) 、 (17.00 ± 1.10) 、 (14.60 ± 0.68) 和 (6.60 ± 1.29) 个,随着盐酸法舒地尔浓度的增加,HLEB-3 细胞的迁移数逐渐减少,差异有统计学意义($F = 57.34, P < 0.05$)。随着盐酸法舒地尔浓度的增加和作用时间的延长,细胞上清液中 COL-I 和 FN 质量浓度逐渐降低,差异均有统计学意义(COL-I: $F_{\text{浓度}} = 143.992, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 113.745, P = 0.000$ 。FN: $F_{\text{浓度}} = 81.761, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 69.602, P = 0.000$);细胞内 α -SMA 质量浓度逐渐下降,差异均有统计学意义($F_{\text{浓度}} = 78.156, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 65.162, P = 0.000$)。结论 盐酸法舒地尔可抑制体外培养 HLEB-3 的增生、迁移及 ECM 的合成,其作用呈剂量和时间依赖性。

【关键词】 Rho 相关激酶/拮抗剂和抑制剂;晶状体上皮细胞/药效;人;细胞迁移;细胞增生;I 型胶原;纤维连接蛋白;细胞外基质;盐酸法舒地尔/药理作用

Inhibition of Rho-kinase inhibitor fasudil on the growth and migration of human LECs and extracellular matrix synthesis Ren Shijie, Zhang Fengyan, Qi Ying, Cui Kunming. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Zhang Fengyan, Email: zhangfengyanx@aliyun.com

[Abstract] **Background** Biological behavior changes of human lens epithelial cells (LECs) and extracellular matrix (ECM) synthesis are major events in the pathogenesis of posterior capsule opacification (PCO). Rho-kinase inhibitor fasudil can inhibit the cytoskeleton remodeling, migration and fibrosis, however, the mechanism of its effect in LECs is below understood. **Objective** This study was to investigate the role of Rho-kinase inhibitor fasudil in proliferation, migration of human LECs and ECM synthesis *in vitro*. **Methods** Human LECs line HLEB-3 cells were regularly cultured and assigned to the control group and the drug treatment groups. Different doses of fasudil were added into the medium to make the final concentrations 10, 20, 40 and 60 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Cell proliferation was assessed by cell counting kit-8 (CCK-8) assay in 12, 24 and 48 hours after addition of drug to calculate the

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.005

作者单位:450052 郑州大学第一附属医院眼科

通信作者:张凤妍, Email: zhangfengyanx@aliyun.com

growth inhibitory rate. Transwell test was employed to detect the migrating number of the cells in 12, 24, 36 and 48 hours after action of drug. The concentrations of collagen type I (COL-I), fibronectin (FN) in cell supernatant and α -smooth muscle actin (α -SMA) content in the cells were measured by ELISA. **Results** The cell growth inhibitory rates in different doses of fasudil groups were higher than that in the control group. The cell growth inhibitory rates were gradually elevated as the increases of fasudil concentrations and prolong of action time ($F_{\text{concentration}} = 966.727, P=0.000; F_{\text{time}} = 280.428, P=0.000$). Transwell migration assay showed that the number of migration cells across polycarbonate membrane was 29.20 ± 1.28 in the control group after 48 hours of incubation, which was much more than $24.40 \pm 1.33, 17.00 \pm 1.10, 14.60 \pm 0.68, 6.60 \pm 1.29$ in the 10, 20, 40 and 60 $\mu\text{mol/L}$ fasudil groups, respectively, with a significant difference among the five groups ($F = 57.34, P < 0.05$). COL-I and FN protein contents in supernatant were gradually declined with the increase of drug concentrations and lapse of time (COL-I: $F_{\text{concentration}} = 143.992, P=0.000; F_{\text{time}} = 113.745, P=0.000$. FN: $F_{\text{concentration}} = 81.761, P=0.000; F_{\text{time}} = 69.602, P=0.000$), and the α -SMA levels in the cells were significantly reduced with the increase of drug concentrations and lapse of time ($F_{\text{concentration}} = 78.156, P=0.000; F_{\text{time}} = 65.162, P=0.000$). **Conclusions** Fasudil can inhibit the proliferation, migration and ECM synthesis of human LECs *in vitro* in a dose- and time-dependent manner.

[**Key words**] Rho-associated kinases/antagonists and inhibitors; Epithelial cells, lens/drug effect; Humans; Cell migration; Cell proliferation; Collagen type I; Fibronectins; Extracellular matrix; Fasudil / pharmacology

白内障囊外摘出术后晶状体囊残留的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 发生增生、迁移、胶原沉积以及晶状体纤维再生可导致后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO), 即后天性白内障。研究表明, 成人白内障术后 5 年内约有 43% 的患者发生 PCO 而导致视力再度下降^[1-3]。Rho 为 Ras 同源物, 是肌动蛋白细胞骨架重新组装过程中的主要调节因子之一, 可激活下游的关键靶效应分子 ROCK, 从而调节 LECs 的多种生物学行为^[4]。盐酸法舒地尔是目前在临床上及实验中常用的 Rho/ROCK 信号通路选择性抑制剂, 可降低细胞内肌球蛋白轻链的磷酸化水平, 从而抑制细胞骨架的重装^[5-6]。关于盐酸法舒地尔对 LECs 的作用机制目前报道尚少。观察盐酸法舒地尔对人 LECs 增生、迁移的作用及其对细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的影响, 为探讨盐酸法舒地尔是否有助于 PCO 的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

DMEM 培养基、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (浙江杭州四季青公司); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) (日本 DOJINDO 公司); 盐酸法舒地尔注射液 (商品名: 川威; 批号: 100804; 规格: 30 mg/2 ml; 天津红日药业股份有限公司); ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司)。Transwell 小室 (美国 Corning 公司); CO₂ 培养箱 (美国 FORMA 公司); 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); 96 孔培养板、6 孔培养板 (美国 Costar 公司); 超净工作台 (苏州净化设备厂);

台式 4 °C 离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HLEB-3 细胞培养和药物处理 HLEB-3 细胞株购自上海吉凯基因化学技术有限公司。在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱内, 用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 低糖细胞培养液培养 HLEB-3 细胞。当细胞贴壁生长至瓶底 80% 后, 用质量分数 0.25% 胰蛋白酶按 1:2 比例消化传代, 待细胞进入对数生长期后进行后续相关实验。

1.2.2 CCK-8 法检测盐酸法舒地尔对 HLEB-3 细胞增生的抑制率 取对数生长期 HLEB-3 细胞, 制备细胞悬液, 将细胞按 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μl 。将细胞分为药物组、对照组、空白组, 药物组在培养液中加入盐酸法舒地尔, 使其终浓度分别为 10、20、40 和 60 $\mu\text{mol/L}$; 对照组加入等容量细胞培养基; 空白组加入等容量 PBS [使用 CCK-8 检测时, 用以扣除空白孔中本底的吸光度 (A)]。每组设 3 个复孔, 放置 37 °C 孵育箱中常规孵育, 分别于培养的 24、48 及 72 h 取样, 每孔加入 CCK-8 10 μl 继续孵育 2 h, 上酶标仪于波长 425 nm 处检测各孔 A 值以计算细胞的增生值, 细胞增生抑制率 = $[1 - (A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.2.3 Transwell 小室法检测 HLEB-3 细胞的迁移 取对数期 HLEB-3 细胞, 去血清培养 12 h 后, 以 200 μl 含不同浓度盐酸法舒地尔的无血清培养基制成单细胞悬液, 以 5×10^5 /孔的密度接种于上室, 下室中加入含有 10% 胎牛血清的完全培养基 500 μl , 培养 48 h, 取出 Transwell 小室, 用棉签拭去上室面的残余细胞, 室温下

在甲醛中固定 10 min, 结晶紫染色 30 min, 清水洗 3 遍, 风干后在光学显微镜下观察细胞的迁移情况, 分别选取上、下、左、右、中间 5 个视野进行细胞计数。

1.2.4 ELISA 法检测 HLEB-3 细胞上清液中 I 型胶原、纤维连接蛋白和细胞中 α -平滑肌肌动蛋白的质量浓度 依照相同的培养程序, 分别以每孔 1×10^6 /ml 的密度传代接种 HLEB-3 细胞于 6 孔板, 每孔 2 ml。待细胞进入对数生长期后, 去血清饥饿培养 12 h。对照组及不同浓度盐酸法舒地尔干预组细胞均分别继续培养 12、24、36 和 48 h。按照上述时间点取各组细胞上清液, 收集于无菌管中, 离心半径 13.5 cm, 4 °C 条件下、3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清。弃去剩余培养液, 每孔加入 400 μ l 细胞裂解液, 室温下振荡 10 min, 收集上清, 4 °C 条件下、3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, 按 ELISA 试剂盒说明书测定上清液中 I 型胶原 (collagen type I, COL-I)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的质量浓度。

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 Shapiro-Wilk 检验均呈正态分布 (均 $P > 0.05$), 以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 各组间均数经 Levene 检验方差齐 ($P > 0.05$)。采用均衡分组多水平实验设计, 不同浓度盐酸法舒地尔在不同时间点对 HLEB-3 增生抑制率、细胞上清中 COL-I 和 FN 质量浓度、细胞中 α -SMA 质量浓度的总体差异比较均采用区组设计两因素方差分析, 不同浓度盐酸法舒地尔组间 Transwell 小室细胞迁移数的差异比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度盐酸法舒地尔作用后对 HLEB-3 细胞增生率的影响

盐酸法舒地尔对 HLEB-3 细胞增生的抑制作用呈时间和浓度依赖性, 随着盐酸法舒地尔干预浓度的增加, 对 HLEB-3 细胞增生抑制逐渐增强, 各组细胞增生抑制率的差异有统计学意义 ($F_{浓度} = 966.727, P = 0.000$)。随着盐酸法舒地尔作用时间的延长, 对 HLEB-3 细胞增生的抑制率作用也逐渐增强, 不同时间对各组细胞的抑制率差异有统计学意义 ($F_{时间} = 280.428, P = 0.000$)。20、40 和 60 μ mol/L 盐酸法舒地尔组的细胞抑制率均明显增强, 差异均有统计学意义 (均 $P = 0.000$)。随着作用时间的延长, 各组内 24 h 和

48 h 的细胞抑制率均较 12 h 增加, 差异均有统计学意义 (均 $P = 0.000$) (表 1)。

表 1 不同浓度盐酸法舒地尔对 HLEB-3 细胞的增生抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 盐酸法舒地尔浓度 (μ mol/L) | 样本量 | 不同时间点细胞增生抑制率 | | |
|-------------------------|-----|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | 12 h | 24 h | 48 h |
| 10 | 5 | 5.45 \pm 0.22 | 7.53 \pm 0.16 ^a | 17.61 \pm 0.34 ^a |
| 20 | 5 | 12.63 \pm 0.19 ^b | 23.59 \pm 0.63 ^{ab} | 34.18 \pm 0.27 ^{ab} |
| 40 | 5 | 30.82 \pm 0.12 ^b | 40.37 \pm 0.25 ^{ab} | 56.99 \pm 0.34 ^{ab} |
| 60 | 5 | 53.36 \pm 0.18 ^b | 61.78 \pm 0.10 ^{ab} | 82.41 \pm 0.43 ^{ab} |

注: $F_{浓度} = 966.727, P = 0.000; F_{时间} = 280.428, P = 0.000$ 。与各自浓度组内 12 h 值比较, ^a $P < 0.01$; 与各自时间点 10 μ mol/L 盐酸法舒地尔组比较, ^b $P < 0.01$ (两因素方差分析, Bonferroni 检验) HLEB-3: 人晶状体上皮细胞株

2.2 不同浓度盐酸法舒地尔作用后 HLEB-3 细胞迁移情况

应用 Transwell 小室进行细胞迁移实验后 48 h, 可见对照组和 10 μ mol/ml 盐酸法舒地尔组细胞的迁移数较多, 而 20 μ mol/L 和 40 μ mol/L 盐酸法舒地尔组细胞明显减少, 60 μ mol/L 盐酸法舒地尔组迁移细胞非常少见 (图 1)。对照组穿过聚碳酸酯膜的细胞数为 (29.20 \pm 1.28) 个, 10、20、40 和 60 μ mol/L 盐酸法舒地尔组迁移的细胞数分别为 (24.40 \pm 1.33)、(17.00 \pm 1.10)、(14.60 \pm 0.68) 和 (6.60 \pm 1.29) 个, 5 个组间总

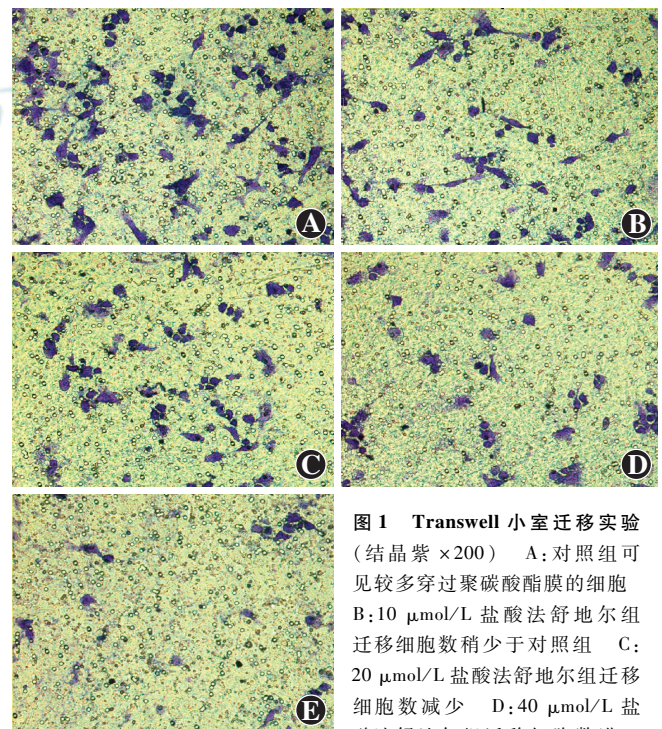


图 1 Transwell 小室迁移实验 (结晶紫 $\times 200$) A: 对照组可见较多穿过聚碳酸酯膜的细胞 B: 10 μ mol/L 盐酸法舒地尔组迁移细胞数少于对照组 C: 20 μ mol/L 盐酸法舒地尔组迁移细胞数减少 D: 40 μ mol/L 盐酸法舒地尔组迁移细胞数进一步减少 E: 60 μ mol/L 盐酸法舒地尔组仅见极少数迁移细胞

体比较差异有统计学意义 ($F = 57.34, P < 0.05$), 其中 20、40 和 60 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组迁移的细胞数均少于对照组及 10 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组, 60 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组细胞迁移数明显少于 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 但 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组与 40 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组间细胞迁移数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组细胞上清液中 COL- I、FN 和细胞中 α -SMA 质量浓度的变化

盐酸法舒地尔对 HLEB-3 细胞分泌 COL- I 有抑制作用, 随着盐酸法舒地尔浓度的增加和作用时间的延长, 细胞上清液中 COL- I 质量浓度逐渐降低, 不同组间和不同时间点间的总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{浓度}} = 143.992, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 113.745, P = 0.000$) (表 2)。随着盐酸法舒地尔浓度的增加, HLEB-3 细胞上清液中 FN 的质量浓度逐渐下降 ($F_{\text{浓度}} = 81.761, P = 0.000$), 随着盐酸法舒地尔作用时间的延长, 细胞上清液中 FN 质量浓度逐渐下降, 差异有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 69.602, P = 0.000$) (表 3)。对照组细胞内 α -SMA 的质量浓度于实验后 24 h 开始升高, 36 h 达高峰, 48 h 有所下降。盐酸法舒地尔作用后 12 h、20、40 和 60 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组细胞内 α -SMA 的质量浓度均明显低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$); 盐酸法舒地尔作用后 24、36 和 48 h, 各浓度盐酸法舒地尔组细胞中 α -SMA 的质量浓度均明显低于对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。各组及不同时间点细胞内 α -SMA 质量浓度的差异均有统计学意义 ($F_{\text{浓度}} = 78.156, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 65.162, P = 0.000$) (表 4)。

表 2 不同浓度盐酸法舒地尔作用不同时间 HLEB-3 细胞上清液中 COL- I 质量浓度 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

| 盐酸法舒地尔浓度 ($\mu\text{mol/L}$) | 样本量 | 不同时间点 COL- I 质量浓度 | | | |
|--------------------------------|-----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 12 h | 24 h | 36 h | 48 h |
| 0 | 5 | 32.21 \pm 1.36 | 38.51 \pm 0.30 | 42.22 \pm 0.55 | 54.46 \pm 0.80 |
| 10 | 5 | 27.93 \pm 0.49 ^a | 35.69 \pm 1.00 | 39.41 \pm 0.34 ^a | 44.97 \pm 2.17 ^b |
| 20 | 5 | 22.87 \pm 1.54 ^b | 30.14 \pm 2.22 ^a | 30.71 \pm 0.89 ^b | 40.29 \pm 1.93 ^b |
| 40 | 5 | 19.90 \pm 0.11 ^b | 23.60 \pm 0.56 ^b | 26.04 \pm 0.60 ^b | 32.13 \pm 1.45 ^b |
| 60 | 5 | 15.93 \pm 0.70 ^b | 18.73 \pm 0.91 ^b | 22.68 \pm 0.65 ^b | 27.10 \pm 1.12 ^b |

注: $F_{\text{浓度}} = 143.992, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 113.745, P = 0.000$. 与各自的 0 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组 (对照组) 比较, ^a $P < 0.05, ^b P < 0.01$ (两因素方差分析, Bonferroni 检验) HLEB-3: 人晶状体上皮细胞株; COL- I: I 型胶原

表 3 不同浓度盐酸法舒地尔作用不同时间 HLEB-3 细胞上清液中 FN 质量浓度 ($\bar{x} \pm s, \text{mg/L}$)

| 盐酸法舒地尔浓度 ($\mu\text{mol/L}$) | 样本量 | 不同时间点 FN 质量浓度 | | | |
|--------------------------------|-----|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | 12 h | 24 h | 36 h | 48 h |
| 0 | 5 | 1.577 \pm 0.009 | 1.784 \pm 0.054 | 2.360 \pm 0.181 | 3.925 \pm 0.090 |
| 10 | 5 | 1.320 \pm 0.026 ^a | 1.529 \pm 0.039 ^a | 1.954 \pm 0.056 ^a | 2.597 \pm 0.155 ^a |
| 20 | 5 | 1.004 \pm 0.014 ^a | 1.302 \pm 0.012 ^a | 1.598 \pm 0.068 ^a | 2.002 \pm 0.106 ^a |
| 40 | 5 | 0.932 \pm 0.014 ^a | 1.003 \pm 0.064 ^a | 1.151 \pm 0.103 ^a | 1.443 \pm 0.041 ^a |
| 60 | 5 | 0.543 \pm 0.069 ^b | 0.672 \pm 0.028 ^b | 0.823 \pm 0.062 ^b | 0.983 \pm 0.066 ^b |

注: $F_{\text{浓度}} = 81.761, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 69.602, P = 0.000$. 与各自的 0 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组 (对照组) 比较, ^a $P < 0.05, ^b P < 0.01$ (两因素方差分析, Bonferroni 检验) HLEB-3: 人晶状体上皮细胞株; FN: 纤维连接蛋白

表 4 不同浓度盐酸法舒地尔作用不同时间 HLEB-3 细胞内 α -SMA 质量浓度 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

| 盐酸法舒地尔浓度 ($\mu\text{mol/L}$) | 样本量 | 不同时间点 α -SMA 质量浓度 | | | |
|--------------------------------|-----|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | 12 h | 24 h | 36 h | 48 h |
| 0 | 5 | 0.215 \pm 0.022 | 0.347 \pm 0.028 | 0.429 \pm 0.046 | 0.392 \pm 0.007 |
| 10 | 5 | 0.204 \pm 0.012 | 0.283 \pm 0.014 ^a | 0.332 \pm 0.018 ^a | 0.313 \pm 0.013 ^a |
| 20 | 5 | 0.158 \pm 0.020 ^a | 0.280 \pm 0.015 ^a | 0.323 \pm 0.017 ^a | 0.293 \pm 0.002 ^b |
| 40 | 5 | 0.124 \pm 0.007 ^b | 0.231 \pm 0.020 ^b | 0.183 \pm 0.031 ^b | 0.126 \pm 0.010 ^b |
| 60 | 5 | 0.084 \pm 0.011 ^b | 0.160 \pm 0.019 ^b | 0.100 \pm 0.029 ^b | 0.059 \pm 0.017 ^b |

注: $F_{\text{浓度}} = 78.156, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 65.162, P = 0.000$. 与各自的 0 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸法舒地尔组 (对照组) 比较, ^a $P < 0.05, ^b P < 0.01$ (两因素方差分析, Bonferroni 检验) HLEB-3: 人晶状体上皮细胞株; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白

3 讨论

PCO 的形成过程主要是白内障术后残留的 LECs 过度增生并移行于后囊膜, 转化为肌成纤维细胞, 表达肌成纤维细胞的表型标志物 α -SMA, 分泌异常 ECM, 如 COL- I、FN 等, 聚集于分化的细胞周围, 细胞骨架重组, 细胞失去极性, 导致细胞的运动和迁移能力增强, 最终导致 PCO 的发生^[7-8]。多种信号通路参与 PCO 的形成过程, 最近研究证明, Rho/ROCK 信号通路在维持 LECs 的生长和晶状体的透明性中起重要作用, LECs 的小 GTP 结合蛋白的表达和分布异常与 Rho GTP 酶的失活均可改变细胞的形态并导致 PCO 的形成^[9], 同时有研究结果显示 ROCK 参与细胞凋亡的过程, 在细胞凋亡发生时 ROCK I 被激活, caspase-3 通过切掉 ROCK I C 末端自动抑制结构域激活 ROCK I, 虽然 caspase 剪切作用选择性地发生在 ROCK I 上^[10], 但在不同的细胞类型中, Rho 激酶可作为抑制凋亡因子, 也可作为促凋亡因子, 关于 Rho/ROCK 信号通路对 LECs 凋亡的影响目前尚有争议, 其凋亡机制中的具体基础机制尚未完全明确^[11]。为进一步探讨 Rho/

ROCK 信号通路对 PCO 形成过程的影响,本研究应用 Rho/ROCK 信号通路选择性抑制剂盐酸法舒地尔作用于体外培养 HLEB-3 细胞,观察其对 HLEB-3 细胞增生、迁移及 ECM 合成的影响。

本研究发现盐酸法舒地尔对 HLEB-3 细胞的增生有显著的抑制作用,随着药物浓度的增加,其对 HLEB-3 细胞增生的抑制效应增强,呈明显的时间和浓度依赖性。已有研究结果证实,异常活化的 Rho 家族能启动肿瘤细胞无限增生、浸润和转移的特性,Rho/ROCK 信号通路在多种恶性肿瘤中均有高表达^[12-13]。本研究细胞迁移实验结果显示,Rho/ROCK 信号通路选择性抑制剂盐酸法舒地尔可抑制 HLEB-3 细胞的运动迁移能力,且随着浓度的增加,抑制效应增强。

体外培养的 HLEB-3 细胞可表达一定量的 COL-I、FN 和 α -SMA。为了检测盐酸法舒地尔对 HLEB-3 细胞 COL-I、FN 合成及对肌成纤维细胞表型标志物 α -SMA 表达的影响,本研究用盐酸法舒地尔干预体外培养的 HLEB-3,结果显示盐酸法舒地尔能降低但未完全抑制肌成纤维细胞表型标志物 α -SMA 的表达,分析 Rho 信号通路的其他成员可能也参与了 HLEB-3 的活化过程。与对照组相比,盐酸法舒地尔能够明显降低 COL-I 和 FN 的表达,由此推断,Rho 信号通路参与 ECM 合成的调控。

综上所述,盐酸法舒地尔能抑制 HLEB-3 细胞增生、迁移及 COL-I、FN 的合成,提示其有可能成为一种治疗 PCO 的新方法,但其详细的调节机制有待于今后进一步研究。

参考文献

- [1] Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated [J]. Arch Ophthalmol, 2009, 127(8): 555-562. doi:10.1001/archophthalmol.2009.3.
- [2] 崔琨明,张凤妍,祁颖,等.灯盏花素对转化生长因子- β_2 诱导的人晶状体上皮细胞上皮-间质转化的影响[J].中华实验眼科杂志, 2013,31(10):930-934. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.10.006.
- [3] 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.
- [4] Lee J, Moon HJ, Lee JM, et al. Smad3 regulates Rho signaling via NET1 in the transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition of human retinal pigment epithelial cells [J]. Biol Chem, 2010, 285(34): 26618-26627. doi:10.1074/jbc.M109.073155.
- [5] Li F, Xia W, Li A, et al. Long-term inhibition of Rho kinase with fasudil attenuates high flow induced pulmonary artery remodeling in rats [J]. Pharmacol Res, 2007, 55(1): 64-71. doi:10.1016/j.phrs.2006.10.009.
- [6] Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases; biochemistry and biology [J]. Anna Rev Cell Dev Biol, 2005, 21(3): 247-269. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.
- [7] 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.
- [8] Rao V, Wawrousek E, Tamm ER, et al. Rho GTPase inactivation impairs lens growth and integrity [J]. Lab Invest, 2002, 82(2): 231-239. doi:10.1038/labinvest.3780415.
- [9] Saika S. Relationship between posterior capsule opacification and intraocular lens biocompatibility [J]. Prog Retin Eye Res, 2004, 23(3): 283-305. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.02.004.
- [10] Hein TW, Rosa RH Jr, Yuan Z. Divergent roles of nitric oxide and rho kinase in vasomotor regulation of human retinal arterioles [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(3): 1583-1590. doi:10.1167/iovs.09-4391.
- [11] Del Re DP, Miyamoto S, Brown JH, et al. RhoA/Rho kinase upregulate Bax to activate a mitochondrial death pathway and induce cardiomyocyte apoptosis [J]. J Biol Chem, 2007, 282(11): 8069-8078. doi:10.1074/jbc.M604298200.
- [12] Sahai E, Marshall CJ. Rho-GTPases and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(2): 133-142. doi:10.1038/nrc725.
- [13] Rattan R, Giri S, Singh AK, et al. Rho/ROCK pathway as a target of tumor therapy [J]. Neurosci Res, 2006, 83(2): 243-255. doi:10.1002/jnr.20707.

(收稿日期:2014-08-19)

(本文编辑:刘艳)

消息

第十四届全国视觉生理大会征文通知

由中华医学会眼科学分会视觉生理学组主办和厦门大学附属厦门眼科中心承办的 2015 年第 14 届全国视觉生理大会将于 2015 年 7 月 3—5 日在福建省厦门市召开,7 月 3 日报到。此次大会为 2015 年眼科和视觉科学的一场盛会。大会将邀请国内外多位著名眼科学专家和视觉科学专家前来作专题讲座,将展示眼科学、视觉科学和视觉电生理学的最新进展、最新技术及最新成果,诚邀国内外眼科专家与同道及眼科企业界人士踊跃出席。现将会议相关内容通知如下:

1 征文主要范围

会议征文主要范围为眼科学及视觉科学的临床、基础、教育、管理及转化研究等方面的内容,特别欢迎视觉生理科学方面的内容。

2 投稿方式

(1) 征文只需投送 500 字以内的中文摘要。(2) 研究性工作的征文摘要应通过“目的、方法、结果、结论”4 个标题来体现研究的主要目的和背景、基线资料和干预观察方法、详实的数据事实结果以及这些结果的临床、科研意义和所能得出的结论等实质信息。(3) 综述性质的征文摘要应体现所述主题的现状、问题和研究方向。(4) 病例报告等性质的征文应包括患者的特征性临床表现以及诊断治疗要点和随访结果。

请将文稿通过电子邮件形式发送至 drlws@qq.com,请以“2015 年第 14 届全国视觉生理大会征文”为主题,邮件正文中请写明作者姓名、职称、单位名称和地址、邮编、手机号码及电子邮件地址。征文截止日期为 2015 年 4 月 31 日,欢迎踊跃赐稿。

3 会务组秘书处联系地址及联系人

会务组秘书处联系地址:福建省厦门市厦禾路 336 号 厦门大学附属厦门眼科中心,邮政编码:361003。联系人:李文生(18610959375)、曹甜(15960258432,0592-2109067)、李燕丽(15960218872)、赖玲璐(18659784728)。传真:0592-2109237;电子邮箱:drlws@qq.com。

(中华医学会眼科学分会视觉生理学组
2015 年第 14 届全国视觉生理大会会务组)