

MsrB1 基因对 H₂O₂ 诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的保护作用

贾义 陈晋

【摘要】 背景 氧化应激被认为是年龄相关性白内障发生的主要因素之一,研究表明蛋氨酸亚砷还原酶 B1 (*MsrB1*) 对于保护晶状体细胞抵抗氧化应激具有重要作用,然而,*MsrB1* 基因沉默对 H₂O₂ 诱导的人晶状体上皮细胞 (LECs) 的凋亡影响的机制尚不清楚。目的 探讨 *MsrB1* 基因沉默对 H₂O₂ 诱导的人 LECs 凋亡及其细胞周期分布的影响。方法 人 LECs 细胞系 SRA01/04 在 DMEM 中进行培养,不同浓度的 H₂O₂ (200、400、600、800 和 1 000 μmol/L) 加入培养基分别处理细胞 12、24 和 36 h 以选择最适浓度和作用时间。细胞分为正常对照组、*MsrB1* siRNA 转染组(将 *MsrB1* siRNA Lipofectamine 2000 质粒转染入 LECs)、H₂O₂ 诱导组(200 μmol/L 作用 LECs 24 h)和 *MsrB1* siRNA 转染联合 H₂O₂ 诱导组(转染 *MsrB1* siRNA 脂质质粒后用 H₂O₂ 处理细胞)。采用 MTT 法检测不同浓度 H₂O₂ 诱导后人 LECs 12、24 和 36 h 细胞的存活率,并筛选 H₂O₂ 处理作用最适的浓度和时间,用于进一步的细胞凋亡诱导实验;Real-time PCR 法检测 *MsrB1* siRNA 转染后 24 h 各组细胞中 *MsrB1* mRNA 的相对表达水平;采用 Hoechst 33528 染色法观察各组细胞的细胞核形态变化;采用碘化丙啶 (PI) 染色法,用流式细胞仪检测细胞凋亡率和不同细胞周期的细胞比例。结果 正常对照组、H₂O₂ 诱导组、*MsrB1* siRNA 转染组细胞中 *MsrB1* mRNA 的相对表达值为 1.063±0.058、1.013±0.049 和 0.235±0.024,*MsrB1* siRNA 转染组细胞中 *MsrB1* mRNA 的相对表达值明显低于正常对照组和 H₂O₂ 诱导组,差异均有统计学意义($t=31.744、35.807$,均 $P<0.001$)。不同浓度 H₂O₂ 处理后 24 h 细胞活力最低,以 200 μmol/L H₂O₂ 处理后 24 h 为诱导人 LECs 凋亡的浓度和时间点。Hoechst 33528 染色显示,H₂O₂ 诱导组可见部分细胞核收缩,*MsrB1* siRNA 转染组可见少数收缩变小的细胞核,*MsrB1* siRNA 转染联合 H₂O₂ 诱导组收缩变小的细胞核多于 H₂O₂ 诱导组。流式细胞术检测结果显示,正常对照组的凋亡细胞占 (1.36±0.35)%,而 *MsrB1* siRNA 转染组占 (3.26±0.31)%,H₂O₂ 诱导组和 *MsrB1* siRNA 转染联合 H₂O₂ 诱导组细胞的凋亡率明显上升,分别为 (5.13±0.59)% 和 (8.73±0.48)%。细胞周期检测结果表明,H₂O₂ 诱导组细胞周期阻滞在 G₂/M 期。*MsrB1* siRNA 转染联合 H₂O₂ 诱导组人 LECs G₁ 期所占比例为 (52.78±1.68)%,明显高于 H₂O₂ 诱导组的 (44.99±1.37)%,而 G₂/M 期细胞比例为 (34.97±2.31)%,明显低于 H₂O₂ 诱导组的 (42.39±1.41)%,差异均有统计学意义($t=6.224、-6.213$,均 $P<0.01$)。结论 *MsrB1* 基因通过调节细胞周期的细胞分布减少 H₂O₂ 诱导的人 LECs 的凋亡。

【关键词】 蛋氨酸亚砷还原酶;基因沉默/药物作用;人;晶状体;上皮细胞/药物作用;细胞凋亡;细胞周期

Role of *MsrB1* gene in protection human lens epithelial cells against H₂O₂-induced apoptosis Jia Yi, Chen Jin. School of Biology and Bioengineering, Guiyang Medical University, Guiyang 550025, China

Corresponding author: Jia Yi, Email: jiaiyiyouxiang@163.com

【Abstract】 **Background** Oxidative stress is one of the major risk factors for age-related cataract, methionine sulfoxide reductase B1 (*MsrB1*) has been shown to play an important role for lens cell function, resistance to oxidative stress. However, the mechanism of *MsrB1* gene silencing on H₂O₂-induced human lens epithelial cells (LECs) apoptosis remains virtually unknown. **Objective** This study attempted to investigate the role of *MsrB1* gene in protecting human LECs against H₂O₂-induced damage. **Methods** Human LECs cell line SRA01/04 cells were cultured in DMEM medium. Different concentrations (200, 400, 600, 800 and 1 000 μmol/L) of H₂O₂ were added to medium treat the cells for 12, 24 and 36 hours respectively to select the optimum inducing dose and time. The cells were divided into 4 groups. Lipofectamine 2000 containing *MsrB1* siRNA was transfected into the cells in the *MsrB1* siRNA transfected group, 200 μmol/L H₂O₂ treated the cells for 24 hours as the H₂O₂-induced group, and *MsrB1*

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.007

基金项目:贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2014]2028号)

作者单位:550025 贵阳医学院生物与工程学院

通信作者:贾义, Email: jiaiyiyouxiang@163.com

siRNA was transfected into the cells before H_2O_2 treatment as the MsrB1 siRNA transfected combined H_2O_2 -induced group. The routinely cultured cells were as normal control group. Cell viability was detected by MTT assay. The relative expression of MsrB1 mRNA in the cells was analyzed by real-time PCR. Morphological changes of nuclei in the cells of different groups were observed using Hoechst 33258 staining under the fluorescence microscope. Cell apoptosis and cell cycle were quantified using flow cytometry. **Results** The relative expressing values of MsrB1 mRNA were 1.063 ± 0.058 , 1.013 ± 0.049 and 0.235 ± 0.024 , and the expressing values of MsrB1 mRNA in the MsrB1 siRNA transfected group were significantly lower than those of the normal control group and H_2O_2 -induced group ($t = 31.744, 35.807$, both at $P < 0.001$). The cell viability was lowest 24 hours after $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 induced. Hoechst 33258 staining showed less contractive decrescent nuclei in the MsrB1 siRNA transfected group, and those in the H_2O_2 -induced group and MsrB1 siRNA transfected combined H_2O_2 -induced group were more. Flow cytometry revealed that the apoptotic rates in the normal control group, MsrB1 siRNA transfected group, H_2O_2 -induced group and MsrB1 siRNA transfected combined H_2O_2 -induced group were $(1.36 \pm 0.35)\%$, $(3.26 \pm 0.31)\%$, $(5.13 \pm 0.59)\%$ and $(8.73 \pm 0.48)\%$. The cells distributed mainly in the G_2/M phase in the H_2O_2 -induced group. The percentage of the cells in the G_1 phase of the MsrB1 siRNA transfected combined H_2O_2 -induced group was $(52.78 \pm 1.68)\%$, which was significantly higher than $(44.99 \pm 1.37)\%$ in the H_2O_2 -induced group ($t = 6.224$, $P < 0.01$), while the percentage of cells in the G_2/M phase also was significantly lower than that in the H_2O_2 -induced group ($[34.97 \pm 2.31]\%$ versus $[42.39 \pm 1.41]\%$) ($t = -6.213$, $P < 0.01$). **Conclusions** MsrB1 gene plays a protecting role on human LECs against oxidative damage by decreasing cell apoptosis through regulating the cell cycle.

[Key words] Methionine sulfoxide reductases; Gene silencing/drug effects; Humans; Lens; Epithelial cells/drug effects; Cell apoptosis; Cell cycle

据报道,白内障已经成为人类致盲和视力残疾的主要因素,且对发展中国家造成了很大的经济和卫生负担^[1-2]。氧化应激被认为是年龄相关性白内障发生的主要因素之一^[3]。 H_2O_2 是晶状体和房水中与生理活动相关的氧化剂之一,白内障患者房水中的 H_2O_2 水平显著高于正常人,且体外研究发现,生理水平的 H_2O_2 会导致晶状体的混浊^[4]。晶状体蛋白中的蛋氨酸很容易被氧化为蛋氨酸亚砷^[5],蛋氨酸亚砷还原酶(methionine sulfoxide reductases, Msrs)又可以将其还原为蛋氨酸^[6]。MsrB1是一种硒蛋白,定位于细胞核和细胞质中,且广泛分布于哺乳动物的不同组织中^[7-8]。有研究表明, MsrB1对于保护晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)以抵抗氧化应激具有重要作用^[7]。虽然 H_2O_2 诱导的人 LECs 凋亡的机制已有报道^[9],但 MsrB1 基因沉默对 H_2O_2 诱导的人 LECs 细胞周期的影响及其机制尚不明确。本研究探讨 H_2O_2 对人 LECs 的损伤过程,并观察 MsrB1 基因沉默对 H_2O_2 诱导的人 LECs 凋亡和细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

人 LECs 系 SRA01/04(美国 Sciencell 公司);高糖 DMEM 培养基、新生小牛血清、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, HEPES)、MTT(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶、青霉素 G、硫酸链霉素(美国 Amresco 公司);Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司);MsrB1 及阴

性对照 siRNA 引物序列由上海吉玛制药技术有限公司合成;焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)、RNA 酶抑制剂、dNTP、M-MLV 逆转录酶、real-time PCR 预混液(含荧光染料 SYBR Green I)、Oligo(dT)₁₈(日本 Toyobo 公司);碘化丙啶(prodium iodide, PI)、Hoechst33258(美国 Sigma 公司)。Opticon-2 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 MJ Research 公司);ModFit LT 流式细胞仪(美国 BD 公司);IX-70 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及加药处理 SRA01/04 细胞用含体积分数 10% 热灭活的新生小牛血清、青霉素 100 U/ml(商品单位)和链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$ (pH 7.4)的 DMEM 培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱内进行培养,将培养的细胞分为正常对照组、MsrB1 siRNA 转染组、 H_2O_2 诱导组和 MsrB1 siRNA 转染联合 H_2O_2 诱导组。

1.2.2 siRNA 质粒转染沉默 MsrB1 基因 MsrB1 siRNA 引物序列^[7]: 5'-GCGUCCGAGCACAUAAGATT-3'(正义链), 5'-UCUAUUGUGCUCGGACGCTT-3'(反义链)。阴性对照 siRNA 引物序列: 5'-UUCUCCG AACGUGUCACGUTT-3'(正义链), 5'-ACGUGACAGG UUCGGAGAATT-3'(反义链)。将调整好细胞密度的悬液接种于 24 孔板($2 \times 10^5/\text{ml}$)和 6 孔板($1 \times 10^6/\text{ml}$)中,待细胞培养 24 h 后,根据操作手册进行基因沉默。(1)用 250 μl DMEM 无血清无双抗培养基稀释 5 μl lipofectamine 2000,并在室温下孵育 5 min。(2)用 250 μl DMEM 无血清培养基稀释 5 μl siRNA 引物。

(3)将稀释过的 lipofectamine 2000 和 siRNA 引物混合均匀,在室温下孵育 20 min,以促使 siRNA 引物/lipofectamine 2000 混合物的形成。(4)于 6 孔板每孔中加入 siRNA 混合物 500 μ l,补无血清无双抗培养基 1.5 ml,并轻轻摇晃培养板使其混匀;24 孔板转染方法与上述方法相同,将 1 μ l lipofectamine 2000 和 siRNA 稀释为 25 μ l,培养板每孔总体积为 500 μ l。转染后 24 h,按照实验分组处理细胞至指定时间,然后收集细胞,用于后续检测,并以 real-time PCR 法鉴定 *MsrB1* 基因的沉默效率。

1.2.3 MTT 法测定细胞存活率 将密度为 2×10^5 /ml 的细胞悬液接种于 24 孔培养板中,培养后 12 h 换用新鲜的无血清培养基继续培养 24 h,用不同浓度 H_2O_2 (200、400、600、800 和 1 000 μ mol/L)处理细胞不同时间(12、24 和 36 h)后测定细胞存活率。测定细胞存活率前 4 h,每孔加入终质量浓度为 0.5 mg/ml 的 MTT 溶液,继续培养 4 h,然后将培养孔内的液体小心吸出,每孔加入 1 000 μ l DMSO,充分溶解 10 min,于 570 nm 波长处测定各孔的吸光度(A)值。细胞存活率(%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.2.4 Real-time PCR 法检测 *MsrB1* mRNA 的相对表达 人 LECs 转染 *MsrB1* siRNA 后 24 h 收集细胞,利用 TRIzol 试剂提取细胞总的 RNA,然后进行逆转录反应,取逆转录产物进行实时荧光定量 PCR。参照文献[10]的方法,选定 *MsrB1* 上游引物为 5'-ATGTCGTTCTGCAGCTTCTTC-3',下游引物为 5'-CACACTTGCCACAGGACAC-3'。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,40 个循环;65~95 $^{\circ}$ C,每 0.5 摄氏度读板 1 次,保持 1 s。参照文献[11]的方法,选定内参 *GAPDH* 上游引物为 5'-TTCACCACCATG GAGAAGGC-3',下游引物为 5'-GGCATGGACTGTGGT CATGA-3',PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min;65~95 $^{\circ}$ C,每 0.5 摄氏度读板 1 次,保持 1 s。参照文献[12]的方法,采用相对定量法检测人 LECs 中 *MsrB1* mRNA 的相对表达,以 *GAPDH* 为内参,运用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目标基因的相对表达水平。

1.2.5 Hoechst 33258 染色法观察细胞核形态变化 将无菌的盖玻片置于 6 孔板中,然后接种细胞密度为 1×10^6 /ml 的悬液,培养 24 h,按照实验分组处理细胞至指定时间。吸尽培养液,加入 0.5 ml 固定液($V_{\text{甲醇}}/V_{\text{冰醋酸}} = 3:1$)固定细胞 10 min 以上(可 4 $^{\circ}$ C 过夜)。弃固定液,用 PBS 洗 2 遍,每次 5 min;加入 0.5 ml Hoechst

33258 染色液,染色 30 min;用 PBS 洗 2 遍,每次 5 min。最后将抗荧光淬灭封片液滴于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,尽量避免气泡,使细胞接触封片液。抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察细胞核的形态变化。

1.2.6 流式细胞仪检测人 LECs 的细胞周期和细胞凋亡率 按照实验分组处理细胞至指定时间后,用冷 PBS 洗涤细胞 2 次,收集细胞,沉淀后用体积分数 70% 乙醇在 -20 $^{\circ}$ C 条件下固定 4 h,然后用 PBS 洗 2 次,悬浮于 0.9 ml 缓冲液中(体积分数 1% PBS 和 0.5 mg/ml RNase A 100 μ l),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,调整细胞密度为 1×10^6 /ml。离心半径 9.8 cm,1 500 r/min 离心 5 min,细胞沉淀中加入 50 μ g/ml PI 染色缓冲液 100 μ l,室温下避光反应 30 min,然后加入 300 μ l PBS,立即用流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡率,样品在 1 h 内测试完毕。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件(软件序列号:4625180487,美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 Levene 检验方差齐。采用单因素干预均衡分组 4 水平实验设计,正常对照组、 H_2O_2 诱导组、*MsrB1* siRNA 转染组 SRA01/04 细胞中 *MsrB1* mRNA 相对表达水平的总体差异比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 LSD-*t* 检验。不同浓度 H_2O_2 诱导组间细胞存活率以及正常对照组、 H_2O_2 诱导组、*MsrB1* siRNA 转染组和 *MsrB1* siRNA 转染联合 H_2O_2 诱导组间细胞凋亡率和不同细胞周期的细胞比例的总体差异比较均采用两因素方差分析,组间的多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *MsrB1* 基因沉默的效率

正常对照组细胞中 *MsrB1* mRNA 的相对表达值为 1.063 ± 0.058 , H_2O_2 诱导组为 1.013 ± 0.049 , *MsrB1* siRNA 质粒转染组为 0.235 ± 0.024 , *MsrB1* mRNA 的表达水平被抑制了 76.5%, *MsrB1* siRNA 质粒转染组细胞中 *MsrB1* mRNA 的相对表达值明显低于正常对照组和 H_2O_2 诱导组,差异均有统计学意义($t = 31.744$ 、 35.807 ,均 $P < 0.001$),表明 siRNA 可以成功抑制 *MsrB1* 基因的表达(图 1)。

2.2 不同浓度 H_2O_2 作用后 LECs 的存活率比较

人 LECs 的存活率随 H_2O_2 浓度的增加呈显著下降

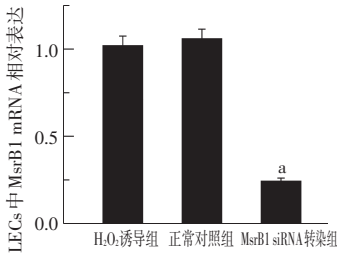


图 1 MsrB1 siRNA 对人 LECs 中 MsrB1 mRNA 表达水平的影响 $F = 305.954, P = 0.000$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$) LECs: 晶状体上皮细胞; MsrB1: 蛋氨酸亚砷还原酶 B1

趋势, 差异有统计学意义 ($F = 703.154, P = 0.000$) (图 2A), 人 LECs 的存活率与 H_2O_2 的作用呈浓度和时间依赖性, 相同浓度处理 24 h 时, 细胞存活率最低, 36 h 后细胞活力恢复 (图 2B)。因此在后续的实验研究中选择 H_2O_2 处理细胞的时间为 24 h。

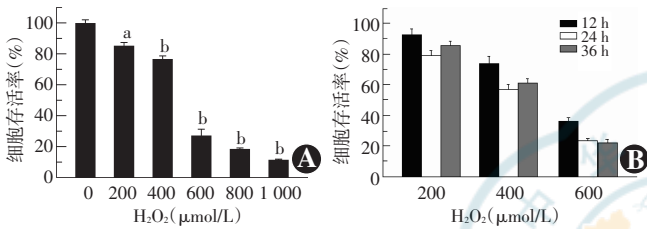


图 2 不同浓度 H_2O_2 作用后人 LECs 细胞存活率的影响 A: 不同浓度 H_2O_2 作用细胞后 12 h 对细胞存活率的影响 $F = 703.154, P = 0.000$. 与 0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组比较, $^a P < 0.01, ^b P < 0.001$ B: 不同浓度 H_2O_2 作用细胞 12、24 和 36 h 对细胞存活率的影响 表明各浓度 H_2O_2 作用 24 h 细胞活力最低

2.3 MsrB1 基因沉默对 H_2O_2 诱导的人 LECs 细胞核形态的影响

Hoechst 33258 染色显示, 正常对照组人 LECs 的细胞核呈均一的蓝色荧光, 细胞核大小均匀 (图 3A), 而在 H_2O_2 诱导组可见部分细胞的细胞核收缩变小 (图 3B)。MsrB1 siRNA 转染组可见变小和变形的细胞核 (图 3C), MsrB1 siRNA 转染联合 H_2O_2 诱导组可见明显的核浓缩和碎片 (图 3D)。

2.4 MsrB1 基因沉默对 H_2O_2 诱导的人 LECs 凋亡率的影响

流式细胞仪检测结果显示, 正常对照组细胞的凋亡率为 $(1.36 \pm 0.35)\%$, MsrB1 siRNA 转染组细胞凋亡率为 $(3.26 \pm 0.31)\%$, H_2O_2 诱导组为 $(5.13 \pm 0.59)\%$, 而 MsrB1 siRNA 转染联合 H_2O_2 诱导组为 $(8.73 \pm 0.48)\%$, 4 个组间细胞凋亡率总体比较差异有统计学意义 ($F = 148.686, P = 0.000$), H_2O_2 诱导组和 MsrB1 siRNA 转染联合 H_2O_2 诱导组细胞的凋亡率明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 15.060, 31.502$, 均 $P < 0.01$) (图 4)。

2.5 MsrB1 基因沉默对 H_2O_2 诱导的人 LECs 细胞周期的影响

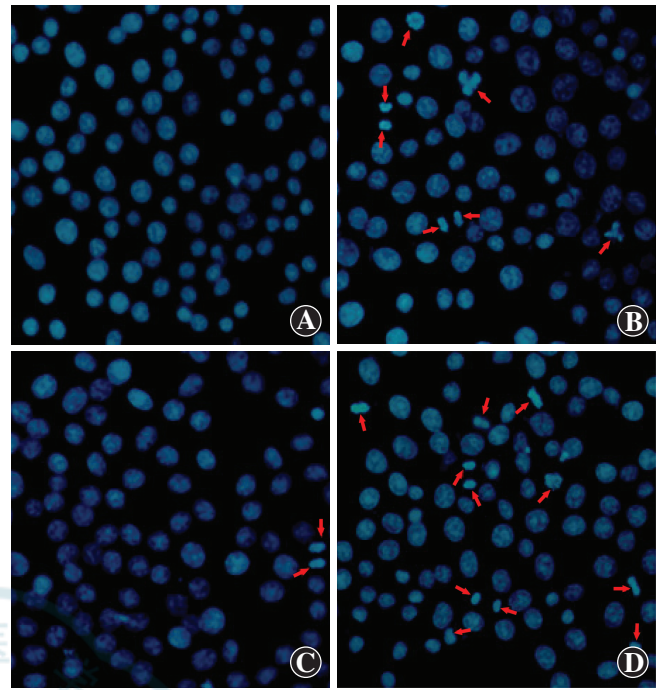


图 3 荧光显微镜下人 LECs 细胞核的变化 (Hoechst 33258 $\times 200$) A: 正常对照组细胞核形态正常 B: H_2O_2 诱导组可见部分细胞核收缩 (红箭头) C: MsrB1 siRNA 转染组可见少数收缩变小的细胞核 (红箭头) D: MsrB1 siRNA 转染联合 H_2O_2 诱导组可见收缩变小的细胞核增多 (红箭头)

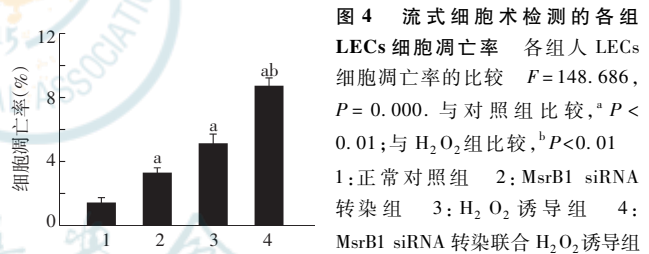


图 4 流式细胞术检测的各组 LECs 细胞凋亡率 各组人 LECs 细胞凋亡率的比较 $F = 148.686, P = 0.000$. 与对照组比较, $^a P < 0.01$; 与 H_2O_2 组比较, $^b P < 0.01$ 1: 正常对照组 2: MsrB1 siRNA 转染组 3: H_2O_2 诱导组 4: MsrB1 siRNA 转染联合 H_2O_2 诱导组

H_2O_2 诱导后, 细胞周期阻滞在 G_2/M 期。MsrB1 siRNA 转染联合 H_2O_2 处理组人 LECs G_1 期所占比例显著高于 H_2O_2 诱导组, 而 G_2/M 期所占比例显著低于 H_2O_2 诱导组, 差异均有统计学意义 ($t = 6.224, -6.213$, 均 $P < 0.01$), MsrB1 基因沉默后 H_2O_2 处理的人 LECs G_2/M 期阻滞趋势减缓, 更多细胞阻滞在 G_1 期 (表 1)。

表 1 各组人 LECs G_1 、S 和 G_2/M 期细胞的比例 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	不同细胞周期的细胞比例		
		G_1	S	G_2/M
正常对照组	3	68.04 \pm 1.68	16.95 \pm 0.63	15.01 \pm 1.67
H_2O_2 诱导组	3	44.99 \pm 1.37	12.62 \pm 0.33	42.39 \pm 1.41
MsrB1 siRNA 转染组	3	69.10 \pm 0.39	15.76 \pm 0.87	15.14 \pm 0.98
MsrB1 siRNA 转染联合 H_2O_2 诱导组	3	52.78 \pm 1.68 ^a	12.25 \pm 0.64	34.97 \pm 2.31 ^a
F		219.008	38.612	211.218
P		0.000	0.000	0.000

注: 与 H_2O_2 诱导组相比, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) LECs: 晶状体上皮细胞; MsrB1: 蛋氨酸亚砷还原酶 B1

3 讨论

最近的研究表明,氧化应激是年龄相关性白内障发生的主要因素之一^[3],且氧化应激诱导的 LECs 凋亡是年龄相关性白内障的早期特征^[13]。有效抑制细胞凋亡则会推迟白内障的发生。研究发现, H_2O_2 会导致晶状体中蛋白质的氧化、脂质体过氧化和 DNA 的损伤,进而引起晶状体混浊^[4]。本研究显示, H_2O_2 对人 LECs 存活率的影响呈浓度和时间效应,随着 H_2O_2 浓度的增加,人 LECs 的死亡率也逐渐升高。相同浓度的 H_2O_2 处理细胞 24 h 后,细胞存活率最低,36 h 后细胞活力恢复,与 Long 等^[9]的研究结果一致。进一步的研究显示, H_2O_2 可以显著增加人 LECs 的凋亡率,*MsrB1* 基因沉默的细胞经 H_2O_2 处理后,人 LECs 的凋亡率进一步升高,与 H_2O_2 诱导组比较,差异有统计学意义。表明 *MsrB1* 基因可以直接或间接地清除活性氧,在保护人 LECs 抑制氧化应激诱导的细胞凋亡中起重要作用。

有关细胞周期阻滞与细胞凋亡的研究表明, G_2/M 期阻滞会导致细胞凋亡的发生^[14-16]。本研究结果显示,*MsrB1* 基因沉默后经 H_2O_2 处理对人 LECs 的细胞周期和细胞凋亡有显著影响。这是因为 *MsrB1* 基因沉默后,细胞中氧化还原水平发生变化,对 DNA 造成损伤^[17],从而影响到细胞周期水平的变化。*MsrB1* 基因沉默后,使人 LECs 对 H_2O_2 造成的 G_2/M 期阻滞效应延缓,推测这可能是由于 *MsrB1* 基因沉默产生的 $O_2 \cdot^-$,使人 LECs 的 G_1 期 DNA 发生损伤,导致更多的细胞阻滞在 G_1 期。本研究中发现,*MsrB1* 基因沉默后细胞凋亡率显著增加,结合细胞周期变化分析,认为 *MsrB1* 基因沉默后经 H_2O_2 处理导致的细胞凋亡主要发生在 G_1 期。Nunes 等^[18]的研究也认为, $O_2 \cdot^-$ 会使细胞周期阻滞在 G_1 期。在酿酒酵母中的研究显示, H_2O_2 会使细胞周期阻滞在 G_2 期^[19],本研究的结果也显示 H_2O_2 诱导组细胞周期阻滞在 G_2/M 期。Deshpande 等^[20]在血管平滑肌细胞中的研究则表明,低浓度的 H_2O_2 会使细胞周期阻滞在 G_1/S 期。

总之, H_2O_2 和 *MsrB1* 基因沉默均可以诱导人 LECs 发生凋亡,当 *MsrB1* 基因沉默细胞经 H_2O_2 进一步处理后,可显著增加人 LECs 的凋亡,且 H_2O_2 和 *MsrB1* 基因沉默引起的细胞凋亡和 G_1 、 G_2/M 期阻滞密切相关。本研究结果提示,*MsrB1* 基因可以直接或间接地清除活性氧,通过调节细胞周期水平变化对 H_2O_2 诱导的人 LECs 细胞凋亡起到保护作用。

参考文献

- [1] Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, et al. Global data on visual impairment in the year 2002 [J]. Bull World Health Organ, 2004, 82(11): 844-851.
- [2] Gohdes DM, Balamurugan A, Larsen BA, et al. Age-related eye diseases: an emerging challenge for public health professionals [J]. Prev Chronic Dis, 2005, 2(3): 1-6.
- [3] Beebe DC, Holekamp NM, Shui YB. Oxidative damage and the prevention of age-related cataracts [J]. Ophthalmic Res, 2010, 44(3): 155-165. doi:10.1159/000316481.
- [4] Gao S, Qin T, Liu Z, et al. Lutein and zeaxanthin supplementation reduces H_2O_2 -induced oxidative damage in human lens epithelial cells [J]. Mol Vis, 2011, 17: 3180-3190.
- [5] Garner MH, Spector A. Selective oxidation of cysteine and methionine in normal and senile cataractous lenses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980, 77(3): 1274-1277. doi:10.1073/pnas.77.3.1274.
- [6] Kantorow M, Hawse JR, Cowell TL, et al. Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2004, 101(26): 9654-9659. doi:10.1073/pnas.0403532101.
- [7] Marchetti MA, Pizarro GO, Sagher D, et al. Methionine sulfoxide reductases B1, B2, and B3 are present in the human lens and confer oxidative stress resistance to lens cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(6): 2107-2112. doi:10.1167/iovs.05-0018.
- [8] Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation [J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(15): 2457-2478. doi:10.1007/s00018-009-0032-4.
- [9] Long AC, Colitz CMH, Bomser JA. Apoptotic and necrotic mechanisms of stress-induced human lens epithelial cell death [J]. Exp Biol Med, 2004, 229(10): 1072-1083.
- [10] Luca AD, Sacchetta P, Nieddu M, et al. Important roles of multiple Sp1 binding sites and epigenetic modifications in the regulation of the methionine sulfoxide reductase B1 (*MsrB1*) promoter [J]. BMC Mol Biol, 2007, 8: 39-50. doi:10.1186/1471-2199-8-39.
- [11] Du S, Zhou J, Jia Y, et al. SelK is a novel ER stress-regulated protein and protects HepG2 cells from ER stress agent-induced apoptosis [J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 502(2): 137-143. doi:10.1016/j.abb.2010.08.001.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [13] Maruno KA, Lovicu FJ, Chamberlain CG, et al. Apoptosis is a feature of TGF beta-induced cataract [J]. Clin Exp Optom, 2002, 85(2): 76-82.
- [14] Zhou T, Li G, Cao B, et al. Downregulation of MeI-1 through inhibition of translation contributes to benzyl isothiocyanate induced cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia cells [J/OL]. Cell Death Dis, 2013, 4(2): e515 [2014-07-22]. http://www.nature.com/cddis/journal/v4/n2/full/cddis201341a.html. doi:10.1038/cddis.2013.41.
- [15] Ji T, Lin C, Krill LS, et al. Flavokawain B, a kava chalcone, inhibits growth of human osteosarcoma cells through G_2/M cell cycle arrest and apoptosis [J/OL]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 55 [2014-08-06]. http://www.molecular-cancer.com/content/12/1/55. doi:10.1186/1476-4598-12-55.
- [16] Shibuya EK. G_2 cell cycle arrest a direct link between PKA and Cdc25C [J]. Cell Cycle, 2003, 2(1): 39-41. doi:10.4161/cc.2.1.291.
- [17] Jia Y, Li Y, Du S, et al. Involvement of *MsrB1* in the regulation of redox balance and inhibition of peroxynitrite-induced apoptosis in human lens epithelial cells [J]. Exp Eye Res, 2012, 100: 7-16. doi:10.1016/j.exer.2012.04.008.
- [18] Nunes E, Siede W. Hyperthermia and paraquat-induced G_1 arrest in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is independent of the *RAD9* gene [J]. Radiat Environ Biophys, 1996, 35(1): 55-57. doi:10.1007/BF01211243.
- [19] Flattery-O' Brien JA, Dawes IW. Hydrogen peroxide causes *RAD9*-dependent cell cycle arrest in G_2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G_1 arrest independent of *RAD9* function [J]. J Biol Chem, 1998, 273(15): 8564-8571. doi:10.1074/jbc.273.15.8564.
- [20] Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P, et al. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle [J]. Antioxid Redox Signal, 2002, 4(5): 845-854. doi:10.1089/152308602760599007.

(收稿日期:2014-09-03)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)