

· 实验研究 ·

光暴露与人晶状体上皮细胞氧化损伤和凋亡的关系及其机制

魏树瑾 南莉 汤欣 丁娜 黄伟 孙二琳

【摘要】 背景 研究表明,光暴露可导致晶状体上皮细胞(LECs)的损伤,与活性氧簇(ROS)的累积和自由基反应有关,其发病机制一直是研究的热点。目的 研究 LECs 光损伤的病理机制。方法 将人 LECs 系 HLEB-3 细胞株进行复苏和培养并分为 4 个组。将 20 000 lx 光照度的发光二极管(LED)光源置于密封的培养箱并光照培养的细胞 6、12、24 h,未行光照射的细胞作为正常对照组。采用流式细胞术检测各组 LECs 内 ROS 的表达及细胞凋亡率,分别使用 real-time PCR 和 Western blot 技术检测各组细胞中 bax 和转化生长因子- β_2 (TGF- β_2) mRNA 及其蛋白的相对表达水平;采用 MTT 法检测并比较正常对照组与光照 24 h 组细胞的增殖值(A_{570})。结果 正常对照组培养的细胞排列紧密,光照后随着时间延长,细胞肿胀,细胞间隙增宽。LECs 内 ROS 平均荧光强度(MFI)、早期凋亡率、总凋亡率随光照时间的延长逐渐上升,各组间总体比较差异均有统计学意义($F=8.276, P=0.036; F=27.878, P=0.006; F=9.333, P=0.028$)。光照 6 h 组、12 h 组和 24 h 组, bax mRNA 的相对表达量较正常对照组分别升高(1.45±0.33)、(5.45±2.58)和(15.86±3.93)倍, TGF- β_2 mRNA 的表达分别升高(1.22±0.12)、(1.79±0.38)和(4.01±0.93)倍,4 个组间总体比较差异均有统计学意义($F=13.679, P=0.023; F=13.320, P=0.024$)。光照 24 h 组 bax 和 TGF- β_2 蛋白的表达量分别较正常对照组升高约 1.85 倍和 2 倍。正常对照组细胞增殖值(A_{570})为 0.959±0.058,明显高于光照 24 h 组的 0.897±0.093,组间差异有统计学意义($t=-3.130, P=0.003$)。结论 20 000 lx 的光照可导致体外培养人 LECs 的氧化损伤和凋亡, bax 和 TGF- β_2 可能参与光诱导人 LECs 的损伤过程。

【关键词】 晶状体上皮细胞; 光损伤; 细胞凋亡; 活性氧; 转化生长因子- β_2

Association of light exposure with oxidative damage and apoptosis of human lens epithelial cells Wei Shujin, Nan Li, Tang Xin, Ding Na, Huang Wei, Sun Erlin. Tianjin Key Lab of Ophthalmology and Visual Science, Tianjin Eye Institute, Tianjin Eye Hospital, Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300020, China
Corresponding author: Tang Xin, Email: tangprofessor@126.com

【Abstract】 **Background** Studies showed that light exposure induce the damage of lens epithelial cells (LECs), and this procedure is associated with the accumulation of reactive oxidative species (ROS) and apoptosis of LECs. However, the mechanism of light damage of LECs is below understood. **Objective** This study was to investigate the pathogenesis mechanism of light-induced LECs damage. **Methods** HLEB-3 strains were resuscitated and cultured and then divided into four groups. A light-emitting diode (LED) light source with the illuminance of 20 000 lx was set in a sealed culture box to irradiated the LECs for 6, 12 and 24 hours, and the cells were regularly cultured without light exposure in the normal control group. The mean fluorescence intensity (MFI) of ROS and apoptosis of the cells in different groups were tested by flow cytometry (FCM). The relative expressions of mRNA and protein of bax and transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2) in the cells of different groups were assayed by real-time PCR and Western blot, respectively. The growth and proliferation were assessed using MTT as absorbance (A_{570}) and compared between the normal control group and the light-exposure 24-hour group. **Results** The cells

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.003

基金项目:国家自然科学基金项目(81270984、61178081);天津市应用基础与前沿技术研究计划(重点项目)(14JCZDJC36300);天津市中医药管理局中医中西医结合科研专项课题项目(13134)

作者单位:300020 天津医科大学眼科临床学院 天津市眼科医院 天津市眼科研究所 天津市眼科学与视觉科学重点实验室(魏树瑾、南莉、汤欣);300211 天津市泌尿外科研究所(丁娜、黄伟、孙二琳)

通信作者:汤欣, Email: tangprofessor@126.com

grew well with the tight arrangement in the normal control group, but cellular swelling and intercellular space widening were seen in the light-exposure 24-hour group. The MFI of ROS in the normal control group, light-exposure 6-hour group, light-exposure 12-hour group and light-exposure 24-hour group was 2.85 ± 0.14 , 3.33 ± 0.21 , 5.82 ± 1.69 , 15.83 ± 5.81 , respectively, showing a significant increase in all the light-exposure groups ($F = 8.276, P = 0.036$). The early apoptosis rate was $(0.17 \pm 0.13)\%$, $(0.35 \pm 0.03)\%$, $(0.74 \pm 0.27)\%$, $(3.12 \pm 0.47)\%$, and the total apoptosis rate was $(0.27 \pm 0.16)\%$, $(0.58 \pm 0.14)\%$, $(1.54 \pm 0.79)\%$, $(5.22 \pm 1.63)\%$ in the normal control group, light-exposure 6-hour group, light-exposure 12-hour group and light-exposure 24-hour group, respectively, with the significant elevation after light exposure ($F = 27.878, P = 0.006$; $F = 9.333, P = 0.028$). The expression of bax mRNA in the light-exposure 6-hour group, light-exposure 12-hour group and light-exposure 24-hour group were (1.45 ± 0.33) , (5.45 ± 2.58) and (15.86 ± 3.93) times more than that in the normal control group, and the expression of TGF- β_2 mRNA in the light-exposure 6-hour group, light-exposure 12-hour group and light-exposure 24-hour group was (1.22 ± 0.12) , (1.79 ± 0.38) and (4.01 ± 0.93) times more than that in the normal control group, showing significant differences among the four groups ($F = 13.320, P = 0.024$). The expressions of bax and TGF- β_2 protein in the light-exposure 24-hour group were about 1.85 times and 2 times higher than those in the normal control group respectively. The absorption luminosity value (A_{570}) was 0.959 ± 0.058 in the normal control group, which was significantly higher than 0.897 ± 0.093 in the light-exposure 24-hour group ($t = -3.130, P = 0.003$). **Conclusions** Light-exposure with illumination of 20 000 lx results in oxidative damage and apoptosis of human LECs *in vitro*. Bax and TGF- β_2 probably participate in damage of LECs induced by light-exposure.

[Key words] Lens epithelial cell; Light damage; Apoptosis; Reactive oxygen; Transforming growth factor- β_2

随着对白内障发病机制研究的逐渐深入,国内外学者逐渐认识到,多种损伤因子可通过不同的途径和机制导致白内障,但是这些因子大多是通过共同的中间产物——自由基损伤晶状体的,因此研究自由基在白内障发生和发展过程中的作用对临床上防治白内障具有重要意义。研究表明,光暴露诱发的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)自由基反应导致的晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)的凋亡与年龄相关性白内障的发生关系密切^[1],而目前有关 LECs 光损伤的模型报道较少,成功建立 LECs 光损伤模型有助于对白内障的发生机制进行更深入的研究。转化生长因子- β_2 (transforming growth factor- β_2 , TGF- β_2)是生物体内调节细胞增生、分化、迁移和凋亡的重要细胞因子,在白内障发生过程中起着重要的作用^[2-3]。TGF- β_2 信号传导通路可能是 H₂O₂ 诱导 LECs 凋亡的起始信号,阻断 TGF- β_2 信号传导通路可抑制 H₂O₂ 诱导的人 LECs 的凋亡^[4]。本研究拟观察光损伤对人 LECs 增生和凋亡的影响,探讨 LECs 光损伤与 ROS 损伤的关系及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司);人 LECs 系 HLEB-3(美国 ATCC 公司);Annexin v/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司);ROS 试剂盒(南京建成生物工程研究所);鼠抗 bax 单克隆抗体

(抗体编号:sc-65532,1:500,美国 Santa Cruz 公司);兔抗 GAPDH 抗体(抗体编号:SRP00849,1:500,天津赛尔生物技术有限公司);RIPA 裂解液、兔抗 TGF- β_2 单克隆抗体(抗体编号:BA0292,1:200)、HRP 标记的羊抗兔抗体(抗体编号:BA1055,1:500)或羊抗鼠抗体(抗体编号:BA1051,1:500)(武汉博士德公司);MTT(德国 Sigma-Aldrich 公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(天津市化学试剂一厂);E. Z. N. ATM DNA/RNA/Protein Isolation Kit(美国 Omega 公司);SuperRT cDNA Kit(北京康为世纪公司)。FC500MPL 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);IQ5 real-time PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司);LabWorksTM 凝胶成像及分析系统(美国 UVP 公司);紫外线分光光度计(美国 Bio-Tek 公司);Eclipse Ti 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);TES 1330A 照度计(中国台湾 TES 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组和干预 将 LECs 复苏后(HLEB-3 细胞株)分为 4 个组,在密闭培养箱内设置发光二极管(light-emitting diode, LED)光源,光照度为 20 000 lx,用直落式照射法照射细胞,光照 6 h 组细胞光照 6 h,光照 12 h 组细胞光照 12 h,2 个组细胞光照后均继续培养至 24 h,光照 24 h 组细胞光暴露 24 h,而正常对照组细胞不进行光照。光照时,细胞平面温度维持在约 37 ℃。

1.2.2 人 LECs 的培养 HLEB-3 细胞株复苏后,体积分数 5% CO₂、37 ℃ 条件下培养于含体积分数 20%

FBS 的 α -MEM 培养液中,每 2 ~ 3 天用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化传代 1 次,当细胞进入对数生长期后,更换新鲜培养液,并进行传代,第 3 ~ 5 代细胞用于实验。传代后达 70% ~ 80% 融合后用 LED 光源 20 000 lx 照射。

1.2.3 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐法检测细胞中 ROS 的平均荧光强度 ROS 检测采用 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐 (2,7-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 法。将 DCFH-DA 加入培养基,终浓度为 10 μ mol/L,对照组加入 DMSO 溶剂,于 37 $^{\circ}$ C 下孵育细胞 30 min,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,然后加入培养基以终止消化,制备细胞悬液,1 000 \times g 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次,收集细胞,用异硫氰酸酯 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 荧光检测条件测定细胞中 ROS 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI)。

1.2.4 流式细胞仪分析凋亡细胞比例 收集各组待检测细胞,按试剂盒说明进行 Annexin v-FITC/PI 双染色检测,其中左上象限代表坏死细胞 (B1: Annexin v-/PI+),右上象限代表晚期凋亡细胞 (B2: Annexin v+/PI+),左下象限代表存活细胞 (B3, Annexin v-/PI-),右下象限代表早期凋亡细胞 (B4, Annexin v+/PI-),计算细胞早期凋亡率和总凋亡率,总凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。实验重复 3 次。

1.2.5 Real-time PCR 法检测细胞中 TGF- β_2 、bax mRNA 的表达情况 按 DNA/RNA/蛋白分离试剂盒说明书提取总 RNA,用紫外线分光光度计检测其纯度和浓度。采用合格的 RNA 标本,按 Super RT cDNA 试剂盒说明书逆转录合成 cDNA,并于 -20 $^{\circ}$ C 保存。TGF- β_2 上游引物序列为 5'-AATCCCTGTGCCGTCTT-3',下游为 5'-CCCAAACAACCAACCC-3'; bax 上游引物序列为 5'-TTGCTTCAGGGTTTCATC-3',下游为 5'-ACACTCGCTCAGCTTCTTG-3'; β -actin 上游引物序列为 5'-CGTGACATTAAGGAGAAGCTG-3',下游为 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC-3'。将所有样品的 cDNA 工作液按如下反应体系分别配制:2 倍 SYBR Premix Ex Taq 7.5 μ l, 5 pmol/ μ l PCR 上下游引物各 1.0 μ l, cDNA 1.0 μ l, DDW 4.5 μ l, 总体积为 15.0 μ l, 混匀放入 real-time PCR 仪。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。55 $^{\circ}$ C 再延伸 30 s, 81 个循环。反应结束后计算机自动绘制各自的标准曲线,由软件自动计算待测样品中的目的基因或 β -actin 的含量, $\Delta\Delta$ Ct = [Ct_{目的基因(样本)} - Ct _{β -actin(样本)}] - [Ct_{目的基因(对照)} - Ct _{β -actin(对照)}]。实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 法检测细胞中 TGF- β_2 和 bax 蛋白的表达 收集细胞, PBS 洗涤细胞 1 次, 加入细胞蛋白裂解液 200 μ l, 用移液器吹打数下。轻摇 5 ~ 10 min, 冰上孵育 1 h, 10 000 \times g 离心 10 min, 取上清, 即为蛋白提取物。蛋白裂解液加入适量 5 倍上样缓冲液后取 40 μ l 各样本, 100 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后进行质量分数 12% SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜转印 1 h, 行 Western blot 检测。质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入相应的一抗和内参抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜。将膜置于 TBST 溶液中, 摇动漂洗 5 min, 共 4 次。将膜置于对应的二抗中, 室温下作用 1 h。TBST 溶液摇动漂洗 5 min, 共 4 次, Western LightningTM Chemiluminescence Reagent 显色剂中作用 3 min, 曝光 1 min, 然后进行显影、定影处理。使用 LabWorksTM 凝胶成像及分析系统进行摄像, 分析各组细胞中 TGF- β_2 、bax 条带的强度 (灰度值) 与 GAPDH (内参) 条带灰度值的比值, 得到校正后 TGF- β_2 、bax 条带的灰度值。实验重复 3 次。

1.2.7 MTT 法检测细胞的增生能力 接种 HLEB-3 细胞于 96 孔板中, 细胞密度为 1 \times 10⁴/孔, 至 70% ~ 80% 融合后进行光照, 光照后 24 h 每孔加 5 mg/ml MTT 溶液 20 μ l, 终质量浓度为 0.5 mg/ml, 置 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中继续培养 4 h, 取出培养板, 吸弃上清, 每孔加 DMSO 150 μ l, 置摇床上, 80 r/min 避光摇动 10 min 以溶解甲臜颗粒。用微孔板分光光度计测定各孔在波长为 570 nm 处的吸光度 (A₅₇₀) 值。正常对照组细胞培养相同时间后按上述方法测量 A₅₇₀ 值。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件 (软件序列号: 9A657E90-E2B7-44DE-8929-055948162595) 进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 Levene 检验证实方差齐。采用均衡分组两水平或多水平实验设计, 4 个组间 ROS、MFI、早期凋亡率、总凋亡率的总体差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Dunnett *t* 检验。正常对照组与光照 24 h 组间细胞中 bax 和 TGF- β_2 mRNA 及其蛋白的相对表达以及细胞增生值的差异比较均采用独立样本 *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 培养细胞的形态及细胞中 ROS 荧光表现

光学显微镜下可见正常对照组的 HLEB-3 细胞呈单层多角形生长, 细胞透明, 细胞质丰富, 细胞间界限

清楚,排列紧密;光照 6 h 组细胞尚透明,细胞间界限尚清楚,细胞间隙有所增大,部分细胞发生肿胀;光照 12 h 组细胞间隙增大,出现萎缩细胞,部分细胞边界不清;光照 24 h 组细胞间隙增大,细胞稀疏,可见部分萎缩的细胞及肿胀的细胞,细胞间界限不清楚。正常对照组 HLEB-3 细胞 ROS MFI 较弱,随光照时间的延长,细胞内 MFI 逐渐增强(图 1)。

2.2 各组细胞内 ROS 荧光强度比较

正常对照组、光照 6 h 组、光照 12 h 组和光照 24 h 组细胞中 ROS 的 MFI 的总体差异有统计学意义($F=8.276, P=0.036$),其中光照 6 h 组、光照 12 h 组和光照 24 h 组细胞中 ROS MFI 值均明显高于正常对照组,

差异均有统计学意义($t=-3.230、-3.025、-3.868$,均 $P<0.05$)(表 1)。

表 1 不同光照组细胞中 ROS MFI 值和凋亡率的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	ROS MFI	早期凋亡率(%)	总凋亡率(%)
正常对照组	3	2.85±0.14 ^a	0.17±0.13 ^a	0.27±0.16 ^a
光照 6 h 组	3	3.33±0.21 ^a	0.35±0.03 ^a	0.58±0.14 ^a
光照 12 h 组	3	5.82±1.69 ^a	0.74±0.27 ^a	1.54±0.79 ^a
光照 24 h 组	3	15.83±5.81	3.12±0.47	5.22±1.63
<i>F</i>		8.276	27.878	9.333
<i>P</i>		0.036	0.006	0.028

注:与光照 24 h 组比较,^a $P<0.05$ (单因素方差分析,Dunnett *t* 检验)
ROS:活性氧簇;MFI:平均荧光强度

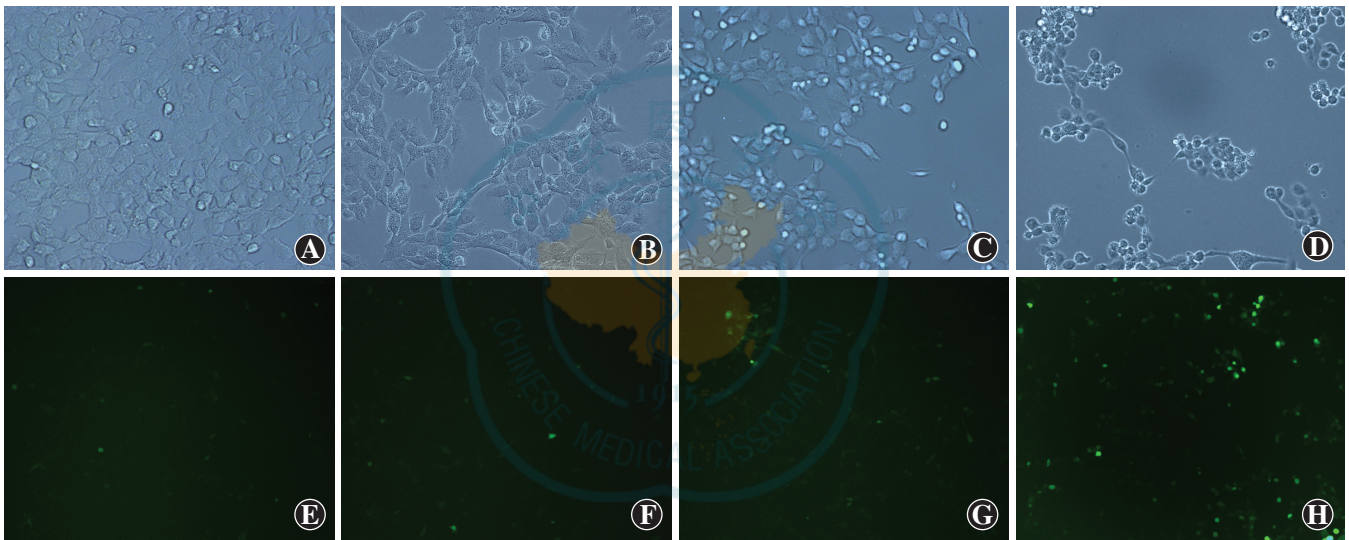


图 1 HLEB-3 细胞的形态及 ROS 表达 A:正常对照组 HLEB-3 细胞呈单层多角形生长,细胞透明,排列紧密,细胞间界限清楚($\times 200$) B:光照 6 h 组 HLEB-3 细胞间隙有所增大,细胞体积变大($\times 200$) C:光照 12 h 组 HLEB-3 细胞间隙增大,出现萎缩细胞,部分细胞边界不清($\times 200$) D:光照 24 h 组 HLEB-3 细胞稀疏,细胞间隙增宽($\times 200$) E:正常对照组细胞中见到极少量 ROS 表达($\times 100$) F:光照 6 h 组可见少量 ROS 表达的细胞,呈绿色荧光($\times 100$) G:光照 12 h 组 ROS 表达的细胞较光照 6 h 组增加($\times 100$) H:光照 24 h 组 ROS 表达的细胞大量增加($\times 100$)

2.3 不同光照组 HLEB-3 细胞凋亡率的比较

正常对照组有少量细胞凋亡,光照 6、12、24 h 组细胞的早期凋亡率及总凋亡率均随光照时间的延长而逐渐上升,4 个组间总体差异均有统计学意义($F=27.878, P=0.006; F=9.333, P=0.028$),其中光照 12 h 组、光照 24 h 组早期凋亡率均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义($t=-3.338、-10.441$,均 $P<0.05$),且光照 24 h 组总凋亡率明显高于正常对照组,差异有统计学意义($t=-5.299, P<0.05$)(图 2,表 1)。

2.4 不同光照时间组细胞中 bax、TGF- β_2 mRNA 相对表达

光照 6 h 组、光照 12 h 组和光照 24 h 组细胞中 bax mRNA 的相对表达水平分别为正常对照组的(1.45±0.33)、(5.45±2.58)和(15.86±3.93)倍,4 个

组间的总体比较差异有统计学意义($F=13.679, P=0.023$)。光照 6 h 组、光照 12 h 组和光照 24 h 组细胞中 TGF- β_2 mRNA 的相对表达量分别为正常对照组的(1.22±0.12)、(1.79±0.38)和(4.01±0.93)倍,4 个组间总体比较差异有统计学意义($F=13.320, P=0.024$)(图 3)。

2.5 光损伤对 HLEB-3 细胞中 bax 和 TGF- β_2 蛋白表达的影响

正常对照组和光照 24 h 组 bax 蛋白表达条带的校正后灰度值分别为 0.047 和 0.087,光照后 24 h, HLEB-3 细胞 bax 蛋白的表达量升高 1.85 倍。正常对照组和光照 24 h 组 TGF- β_2 蛋白条带的校正后灰度值分别为 0.114 和 0.238,光照后 24 h, HLEB-3 细胞 TGF- β_2 蛋白的表达量升高约 2 倍(图 4,5)。

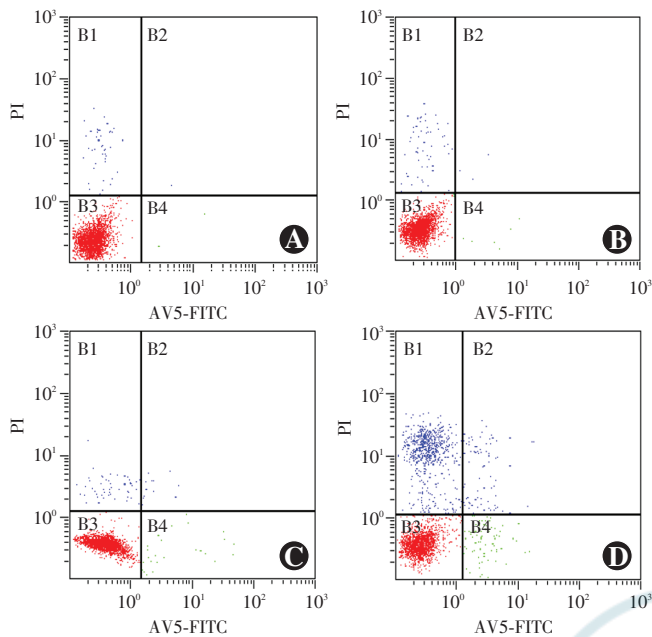


图 2 不同光照组 HLEB-3 细胞的凋亡率 细胞早期凋亡率(B4)及总凋亡率(总凋亡率 = B4+B2)随照射时间的延长逐渐上升,正常对照组、光照 6 h 组、光照 12 h 组和光照 24 h 组早期凋亡率分别为 0.10%、0.34%、0.8% 和 3.29%;总凋亡率分别为 0.14%、0.48%、1.21% 和 6.24% A:正常对照组 B:光照 6 h 组 C:光照 12 h 组 D:光照 24 h 组 FITC:异硫氰酸酯;PI:碘化丙啶

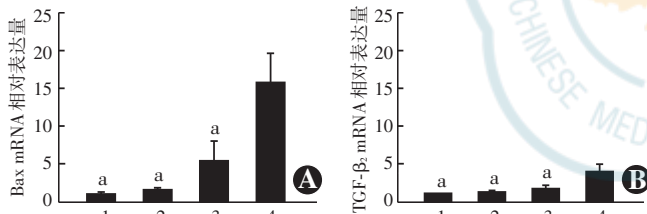


图 3 光损伤对 HLEB-3 细胞内 *bax*、*TGF-β₂* 基因表达的影响 随着光照时间的延长, HLEB-3 细胞内 *bax* 和 *TGF-β₂* 基因表达逐渐上升, 各组间整体比较差异均有统计学意义 ($F=13.679, P=0.023; F=13.320, P=0.024$) 注: 与光照 24 h 组比较, $^a P<0.05$ (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验) 1: 正常对照组 2: 光照 6 h 组 3: 光照 12 h 组 4: 光照 24 h 组 TGF: 转化生长因子

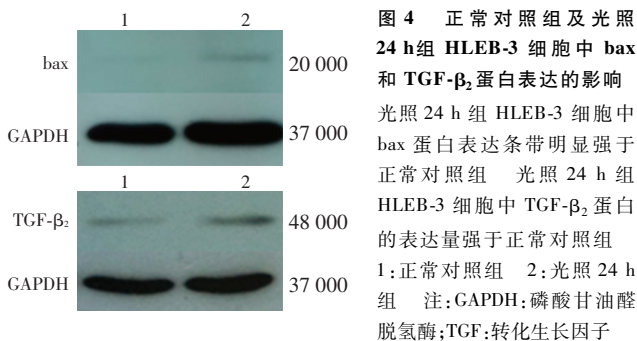


图 4 正常对照组及光照 24 h 组 HLEB-3 细胞中 *bax* 和 *TGF-β₂* 蛋白表达的影响 光照 24 h 组 HLEB-3 细胞中 *bax* 蛋白表达条带明显强于正常对照组 光照 24 h 组 HLEB-3 细胞中 *TGF-β₂* 蛋白的表达量强于正常对照组 1: 正常对照组 2: 光照 24 h 组 注: GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; TGF: 转化生长因子

2.6 各组 HLEB-3 细胞的增殖值比较

光照 24 h 组 HLEB-3 细胞的增殖值 (A_{570}) 为 0.897 ± 0.093 , 明显低于正常对照组的 0.959 ± 0.058 , 光照后细胞增殖能力有所下降, 差异有统计学意义 ($t=-3.130, P=0.003$) (图 5)。

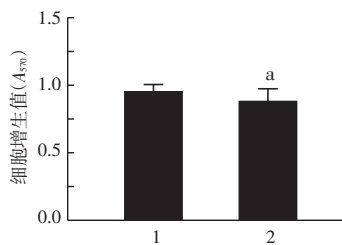


图 5 光照对 HLEB-3 细胞增生的影响 与正常对照组比较, $^a P<0.05$ (独立样本 *t* 检验) 1: 正常对照组 2: 光照 24 h 组

3 讨论

LECs 凋亡是除先天性白内障以外所有类型白内障形成的细胞学基础^[3]。研究表明, 白内障与氧化自由基导致的 LECs 的凋亡有直接关系, 氧化应激是白内障进展的早期因素^[5-6], 然而氧化应激导致 LECs 凋亡的机制尚未被完全阐明^[3]。

氧化应激过程中的产物 ROS 包括超氧化物阴离子、过氧化氢和羟自由基等。正常晶状体也产生 ROS, 它们也具有某些正常的生理功能, 如代谢贮能、转化排泄等, 这些功能重要而不可缺少。生理情况下产生的自由基受抗自由基系统的制约, 但在体内外其他因素的影响下, 平衡状态会被破坏, 导致自由基生成增多, 局部浓度过高, 从而产生对晶状体的损伤作用^[7]。白内障的发生和发展与晶状体氧化损伤有密切的联系^[6]。

在本研究中, 随 LED 光源照射时间的延长, LECs 内 ROS 的含量以及凋亡相关 *bax* 基因和蛋白的表达量均逐渐增加。本研究应用流式细胞术进行细胞凋亡检测, 进一步证实 LED 光源 20 000 lx 照射成功诱导了 LECs 凋亡, 随光照时间的延长, HLEB-3 早期凋亡率和总凋亡率有所上升, 同时细胞增殖能力有所下降。LECs 可见光光损伤模型的建立在国内外的报道非常少见, 本研究中的造模方法使细胞内 ROS 含量增加、凋亡相关基因及蛋白的表达增加、细胞凋亡增加、细胞增殖力下降, 较准确地再现了光损伤的病理过程, 有助于今后对晶状体光损伤及白内障发生机制进行更加深入的研究。

ROS 能引起脂类过氧化、DNA 断裂、蛋白质变性等改变, 参与一系列炎症和变性疾病的形成, 亦被认为是细胞凋亡的第二信使, 参与细胞凋亡过程。研究表明, 自由基可与碱基发生加成反应而造成对核苷、糖苷的氧化改变, 还可从核酸戊糖中夺取氢离子而引起 DNA 的氢键断裂、碱基降解和主链解旋^[8]。Li 等^[9]将牛 LECs 置于 40 mmol/L 或者 400 mmol/L H_2O_2 中后 2 h 发现, 超过 50% 的 DNA 发生解链, 移除 H_2O_2 后 30 min, 断裂的 DNA 链几乎全部再聚集, 浓度高达 400 mmol/L 的 H_2O_2 可严重地影响 DNA 的合成和复

制,使细胞不可逆性丧失增生功能。Dudek 等^[10]指出,在哺乳动物的晶状体中,由于光氧化等原因造成细胞氧化损害,引起细胞基因表达的改变,以上过程与白内障的形成有因果关系。

本研究在人 LECs 光损伤诱导凋亡过程中, TGF- β_2 表达增加。TGF- β_2 可能参与了 LED 光源诱导的 LECs 凋亡的过程,可能与 ROS 损伤相关。TGF- β_2 /Smad3 信号传导途径参与了多种组织细胞的凋亡过程。TGF- β 是由 112 个氨基酸组成的多肽通过二硫键相连的二聚体,哺乳动物 TGF- β 有 TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 共 3 个亚型,三者是生物体内调节细胞增生、分化、迁移和凋亡等的重要细胞因子^[2],在白内障发生过程中起重要作用^[3]。TGF- β_2 具有双向细胞分裂调节的功能,它一方面促进人及动物 LECs 增生、分化和成熟,另一方面又具有抑制细胞增生的作用^[11]。在 TGF- β 诱导的白内障模型中,细胞具备凋亡的形态学和分子特征^[12]。

TGF- β 参与多种白内障的形成和发展过程,如在糖性白内障的发生过程中, TGF- β 在晶状体中表达增加^[13],在年龄相关性白内障 LECs 中 TGF- β_2 mRNA 的表达水平高于对照组, TGF- β_2 的高表达提示其可能参与了年龄相关性白内障 LECs 的凋亡,在年龄相关性白内障的发生和发展过程中起重要作用^[14]。TGF- β 信号传导通路可能与晶状体氧化损伤有关,有研究指出 TGF- β_2 信号传导通路参与了 H₂O₂ 孵育诱导人 LECs 凋亡的信号传导,可能是其起始者,阻断 TGF- β_2 信号传导通路对于 H₂O₂ 孵育诱导人 LECs 凋亡有一定的抑制作用^[4],另外有研究指出谷胱甘肽等体内的抗氧化系统可以对抗 TGF- β 引起的白内障的作用^[15]。

近年来的研究多集中于眼组织中氧化/抗氧化物质的测定及抗氧化物对组织的保护作用,对氧化应激分子生物学通路的研究相对较少^[16]。本研究用光诱导 LECs 凋亡,更准确地模拟了 LECs 光损伤导致细胞凋亡的病理过程,有助于今后在此基础上对晶状体光损伤和白内障形成机制进行更加深入的研究,且对氧化应激分子生物学通路进行了探索,观察了 LECs 凋亡过程中 TGF- β_2 表达的情况,结果显示 TGF- β_2 可能参与了 LED 光源诱导的 LECs 凋亡的过程,可能与 ROS 损伤相关,通过抑制氧化应激及 TGF- β_2 相关信号传导途径可能会成为白内障防治的一种新途径。光损伤和氧化应激导致 LECs 凋亡的机制尚未被完全阐明,还需要今后进一步研究。

参考文献

[1] Kernt M, Hirneiss C, Neubauer AS, et al. Coenzyme Q10 prevents

human lens epithelial cells from light-induced apoptotic cell death by reducing oxidative stress and stabilizing BAX/Bcl-2 ratio[J/OL]. Acta Ophthalmologica, 2010, 88(3): e78-86[2014-03-26]. <http://online.library.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-3768.2010.01875.x/full>. doi:10.1111/j.1755-3768.2010.01875.

- [2] Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological condition[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 121(6): 233-251. doi:10.1042/CS20110086.
- [3] Li WC, Kuszak JR, Dunn K, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals[J]. J Cell Biol, 1995, 130(1): 169-181. doi:10.1083/jcb.130.1.169.
- [4] Cao X, Li X, Bao Y. Hydrogen peroxide-induced cellular apoptosis is mediated by TGF- β_2 signaling pathway in cultured human lens epithelial cells[J]. Int Ophthalmol, 2010, 30(3): 229-237. doi:10.1007/s10792-009-9309-8.
- [5] Ottonello S, Foroni C, Carta A, et al. Oxidative stress and age-related cataract[J]. Ophthalmologica, 2000, 214(1): 78-85. doi:10.1159/000027474.
- [6] Varma SD, Kovtun S, Hegde KR. Role of ultraviolet irradiation and oxidative stress in cataract formation-medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists[J]. Eye Contact Lens, 2011, 37(4): 233-245. doi:10.1097/ICL.0b013e31821ec4f2.
- [7] Elejalde Guerra JI. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment[J]. Ann Med Int, 2001, 18(6): 326-335.
- [8] Gracy RW, Talent JM, Kong Y, et al. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? [J]. Mutat Res, 1999, 428(1-2): 17-22. doi:10.1016/S1383-5742(99)00027-7.
- [9] Li Y, Yan Q, Pendergrass WR, et al. Response of lens epithelial cells to hydrogen peroxide stress and the protective effect of caloric restriction[J]. Exp Cell Res, 1998, 239(2): 254-263. doi:10.1006/excr.1997.3870.
- [10] Dudek EJ, Shang F, Taylor A, et al. H₂O₂-mediated oxidative stress activates NF- κ B in lens epithelial cells[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(5): 651-658. doi:10.1016/S0891-5849(01)00634-7.
- [11] Sun JK, Iwata T, Zigler JS Jr, et al. Differential gene expression in male and female rat lenses undergoing cataract induction by transforming growth factor-beta (TGF-beta)[J]. Exp Eye Res, 2000, 70(2): 169-181. doi:10.1006/excr.1999.0771.
- [12] 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. doi:10.1111/j.1444-0938.2002.tb03012.x.
- [13] Zhang P, Xing K, Randazzo J, et al. Osmotic stress, not aldose reductase activity, directly induces growth factors and MAPK signaling changes during sugar cataract formation[J]. Exp Eye Res, 2012, 101: 36-43. doi:10.1016/j.exer.2012.05.007.
- [14] 李桂荣,周鸿雁,张文松. 转化生长因子 β_2 (TGF- β_2) 在老年性白内障与正常晶状体上皮细胞中 mRNA 表达的差异[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(7): 1148-1149. doi:10.3969/j.issn.1007-4287.2011.07.041.
- [15] Chamberlain CG, Mansfield KJ, Cerra A. Glutathione and catalase suppress TGFbeta-induced cataract-related changes in cultured rat lenses and lens epithelial explants[J]. Mol Vis, 2009, 15: 895-905.
- [16] 黄煜,郭海科,孟倩丽. 氧化应激机制在眼科疾病研究中的新进展[J]. 眼科新进展, 2012, 32(1): 91-94.

(收稿日期:2014-08-24)

(本文编辑:刘艳)