· 实验研究 ·

氯化锌对体外培养人晶状体上皮细胞生长的抑制作用及其机制

杜宇翔　郭大东　唐凯　司俊康　沙芳　吴秋欣　毕宏生

【摘要】 **背景**　锌离子有抑制肿瘤细胞增生、诱导癌细胞凋亡的作用，眼科常用于结膜炎和沙眼治疗的局部用药。迄今为止，关于锌离子对人晶状体上皮细胞（LECs）增生的研究较少。 **目的**　研究氯化锌（$ZnCl_2$）对人 LECs 细胞株 HLEB-3 增生的影响及其作用机制。 **方法**　对 HLEB-3 进行常规细胞培养和传代，在培养基中加入不同质量浓度的 $ZnCl_2$，使终质量浓度分别为 5、10、20、40 和 80 mg/L，继续培养细胞 24、48 和 72 h，未添加 $ZnCl_2$ 的细胞作为对照组。采用 MTT 法检测各组培养细胞的活力；采用 JC-1 荧光染色法测定细胞线粒体膜电位（ΔΨm）的变化；采用流式细胞仪检测不同细胞周期的细胞比例；采用实时荧光定量 PCR 法和 ELISA 法分别检测细胞中 bcl-2 mRNA 及其蛋白的表达量，并对各组检测结果进行比较。 **结果**　对照组培养的细胞呈镶嵌多边形，排列紧密；不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组细胞数目均减少，形态不规则，细胞排列紊乱。随着 $ZnCl_2$ 质量浓度的增加和 $ZnCl_2$ 作用时间的延长，细胞生存率均明显降低，总体比较差异均有统计学意义（$F_{质量浓度}=173.949$，$P=0.000$；$F_{时间}=16.997$，$P=0.000$）。对照组细胞膜呈橙红色荧光，随着 $ZnCl_2$ 质量浓度的增加，不同质量浓度 $ZnCl_2$ 处理后橙红色荧光逐渐减弱，绿色荧光逐渐增强。不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组处于 S 期和 G_2/M 期的细胞比例明显多于对照组，而 G_0/G_1 期的细胞明显少于对照组，总体差异均有统计学意义（S 期：$F=15.594$，$P=0.000$；G_2/M 期：$F=12.792$，$P=0.000$；G_0/G_1 期：$F=43.366$，$P=0.000$）。对照组细胞中 bcl-2 mRNA 的相对表达量为 1.00±0.00，而 5、10、20、40 和 80 mg/L $ZnCl_2$ 组 bcl-2 mRNA 的相对表达量分别降至 0.32±0.13、0.07±0.03、0.14±0.05、0.01±0.00 和 0.12±0.06，差异均有统计学意义（均 $P<0.01$）；对照组细胞中 bcl-2 蛋白的表达水平为（138.57±32.80）pg/mg，5、10、20、40 和 80 mg/L $ZnCl_2$ 组分别为（79.20±5.70）、（79.95±6.21）、（61.02±10.74）、（72.05±11.61）和（55.97±10.53）pg/mg，均明显低于对照组，差异均有统计学意义（均 $P<0.01$）。 **结论**　$ZnCl_2$ 可使 HLEB-3 细胞阻滞于 G_2/M 期，从而抑制细胞的增生，其作用机制可能与 $ZnCl_2$ 引起 ΔΨm 下降和下调 bcl-2 在细胞中的表达有关。

【关键词】 锌离子；晶状体；上皮细胞；*Bcl-2* 基因；细胞增生

Suppression and mechanism of zinc chloride on viability of human lens epithelial cells *in vitro*

Du Yuxiang, Guo Dadong, Tang Kai, Si Junkang, Sha Fang, Wu Qiuxin, Bi Hongsheng. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, China

Corresponding author: Bi Hongsheng, Email: bhs201307@163.com

[**Abstract**] **Background**　Zinc ions can inhibit the proliferation of tumor cells and induce the apoptosis of cancer cells and commonly used in the topical treatment of conjunctivitis and trachoma. However, the effect of zinc ions on proliferation of human lens epithelial cells (LECs) is still unclear. **Objective**　The purpose of the present study was to investigate the effect of $ZnCl_2$ on human LECs proliferation and its mechanism. **Methods**　Human LECs strains, HLEB-3 cells, were routinely cultured and passaged. Different concentrations of $ZnCl_2$ was added into the medium to make the final concentrations to 5, 10, 20, 40 and 80 mg/L for 24, 48 and 72 hours, and the cultured cells without $ZnCl_2$ were as the control group. Viability of the cells was detected by MTT assay; the mitochondrial membrane potential (ΔΨm) was measured using the JC-1 assay kit; the proportion of the cells in different cycles was detected using flow cytometry; meanwhile, the expressions of *bcl-2* gene and bcl-2 protein were assayed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique, respectively. **Results**　Cultured cells showed polygon-like with the tight arrangement in the control group. However, the number of the cells was obviously decreased with the irregular shape and disorder arrangement in different concentrations of $ZnCl_2$ groups. The viability of the cells was significantly reduced with the increase of $ZnCl_2$ concentrations and the lapse of active time ($F_{concentrations}=173.949$, $P=0.000$; $F_{time}=16.997$, $P=0.000$). The strong orange fluorescence in cellular

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.004

基金项目：国家自然科学基金项目（81072961）；山东省自然科学基金项目（ZR2010HM032）

作者单位：250002 济南，山东中医药大学（杜宇翔、唐凯、司俊康、沙芳）；250002 济南，山东中医药大学眼科研究所　山东省高校中西医结合眼病防治技术重点实验室（郭大东、吴秋欣、毕宏生）

通信作者：毕宏生，Email：bhs201307@163.com

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

membrane was seen in the control group, but the orange fluorescence was gradually weakened and green fluorescence was gradually enhanced with the increase of concentrations of $ZnCl_2$. The cell proportions in S phase and G_2/M phase were significantly raised and those in the G_0/G_1 phase were declined in different concentrations of $ZnCl_2$ groups in comparison with the control group (S phase: $F=15.594$, $P=0.000$; G_2/M phase: $F=12.792$, $P=0.000$; G_0/G_1 phase: $F=43.366$, $P=0.000$). The mean relative expression levels of bcl-2 mRNA in the cells were 1.00±0.00 in the control group, which were significantly higher than 0.32±0.13, 0.07±0.03, 0.14±0.05, 0.01±0.00 and 0.12±0.06 in the 5, 10, 20, 40 and 80 mg/L $ZnCl_2$ groups (all at $P<0.01$). The expressing levels of bcl-2 protein in the cells were (138.57±32.80) pg/mg, which were significantly higher than (79.20±5.70), (79.95±6.21), (61.02±10.74), (72.05±11.61) and (55.97±10.53) pg/mg in the 5, 10, 20, 40 and 80 mg/L $ZnCl_2$ groups (all at $P<0.01$). **Conclusions** $ZnCl_2$ can arrest the HLEB-3 cells in G_2/M phase and therefore suppresses the proliferation of HLEB-3 cells probably by reducing the ΔΨm and down-regulating the expression of bcl-2.

[**Key words**] Zinc ion; Lens; Epithelial cell; *Bcl-2* gene; Cell proliferation

锌是生命体内重要的微量元素，与生长和繁殖密切相关[1-2]，锌离子在眼科曾用于结膜炎和沙眼等眼表疾病的局部治疗。研究表明，眼部组织，如视网膜、脉络膜和晶状体细胞中的锌离子含量明显高于其他组织[3]。此外，锌离子可抑制肿瘤细胞的增生及诱导癌细胞的凋亡[4]。白内障囊外摘出术后残余晶状体上皮细胞（lens epithelial cells, LECs）的增生与后囊膜混浊（posterior capsular opacification, PCO）密切相关。为了探讨应用氯化锌（$ZnCl_2$）防治 PCO 的可行性，本研究观察 $ZnCl_2$ 对人体外培养 LECs 增生的影响。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及仪器

人 LECs 株 HLEB-3 细胞（美国 ATCC 公司）；改良型 RPMI-1640 培养基、体积分数 10% 胎牛血清、质量分数 0.25% 胰蛋白酶、MTT、线粒体膜电位（ΔΨm）检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、pH 7.2～7.4 PBS（深圳碧云天生物技术研究所）；TRIpure Reagent RNA 提取试剂盒（北京艾德莱生物科技有限公司）；人 bcl-2 酶联免疫分析试剂盒（武汉基因美生物技术有限公司）。洁净工作台（上海博迅实业有限公司医疗设备厂）；微量移液器（美国 Thermo 公司）；高速冷冻台式离心机（中国香港力新生物医疗科技控股有限公司）；超低温冷冻储存箱（合肥中科美菱低温科技有限责任公司）；XCELLigenece 实时细胞电子分析系统（德国 Roche 公司）；酶标仪（美国 BioTek 公司）；MX3000P 实时荧光定量 PCR 测定仪（美国 Agilent 公司）；超声波细胞粉碎机（西安比朗生物科技有限公司）；HH-2 型数显恒温水浴锅（江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司）；K5600 型微量紫外分光光度计（北京凯奥科技发展有限公司）；IX71 型荧光显微镜（日本 Olympus 公司）。

1.2　方法

1.2.1　HLEB-3 细胞的培养　参照庄晓东等[5]的方法对 HLEB-3 细胞进行常规培养和传代。培养液为含有 10% 胎牛血清和质量分数 1% 青链霉素的 RPMI-1640 细胞培养液，细胞培养于体积分数 5% CO_2 的 37 ℃恒温培养箱，待细胞生长至 80% 融合时收集细胞，将细胞按 1.5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中生长过夜。在每孔培养液中加入不同质量浓度的 $ZnCl_2$，使终质量浓度分别为 5、10、20、40 和 80 mg/L，继续培养 24 h，未添加 $ZnCl_2$ 的细胞作为对照组。倒置显微镜下观察细胞的形态学变化。

1.2.2　MTT 法检测培养细胞的生存率　取对数生长期的细胞，用质量浓度 0.25% 胰蛋白酶消化，将细胞以 8.0×10^3/孔的密度接种于 96 孔板，每孔细胞悬液为 100 μl，培养过夜，加入不同质量浓度的 $ZnCl_2$（同 1.2.1），终体积为 200 μl，未添加 $ZnCl_2$ 的细胞作为对照组，每组设 4 个复孔。细胞分别孵育 24、48 和 72 h 后，每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl，继续孵育 4 h，弃上层液体，每孔加入 150 μl DMSO，避光振荡 10 min 后，用酶标仪在 490 nm 波长处测得吸光度（*A*）值。实验重复 3 次。

1.2.3　JC-1 荧光染色法测定细胞 ΔΨm　将 HLEB-3 细胞按 1.5×10^5/孔的密度接种于 6 孔板中培养过夜。培养液中分别加入不同质量浓度 $ZnCl_2$（同 1.2.1），孵育细胞 4 h，未添加 $ZnCl_2$ 的细胞作为对照组。依据 ΔΨm JC-1 试剂盒方法配制 JC-1 工作液。室温下用 PBS 洗去上层悬浮细胞，每孔加入 1 ml JC-1 染色工作液，37 ℃孵育 20 min，孵育期间按试剂盒说明书的方法配制 JC-1 染色缓冲液，并置于冰浴。孵育结束后吸除上清，用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次，加入2 ml细胞培养液，荧光显微镜下观察并拍照。正常细胞 ΔΨm JC-1 以聚合体的形式存在，呈红色荧光；细胞损伤后 ΔΨm 下降，JC-1 以单体的形式存在，呈绿色荧光。

1.2.4　流式细胞仪检测不同细胞周期的细胞比例　将培养的细胞按 1.5×10^5/孔的密度接种于 6 孔板中，培养过夜，然后培养液中分别添加不同质量浓度 $ZnCl_2$

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

(同 1.2.1),未添加 $ZnCl_2$ 的细胞作为对照组。继续培养 8 h,消化并收集细胞,PBS 洗 3 次,加入冰浴预冷的体积分数 70% 乙醇,4 ℃固定过夜。再将固定的细胞用 PBS 洗 2 次。按试剂盒说明书配制碘化丙啶(propidium iodide,PI)染色液。每管样品加入 0.5 ml PI 染色液,37 ℃避光温浴 30 min,行流式细胞仪检测。

1.2.5　实时荧光定量 PCR 检测细胞中 bcl-2 mRNA 的相对表达　将细胞按 1.5×10^5/孔的密度接种于 6 孔板中培养 24 h。不同质量浓度的 $ZnCl_2$(同 1.2.1)处理细胞,未添加 $ZnCl_2$ 的细胞作为对照组,2 h 后消化收集细胞。每组加入 1 ml Tripure,室温放置 5 min。加入 200 μl 氯仿,摇荡混匀,室温下孵育 2 ~ 3 min,4 ℃条件下、12 000×*g* 离心 15 min。然后取上层水相置于新的离心管中,加 500 μl 异丙醇,室温放置 10 min,4 ℃条件下、2 000×*g* 离心 10 min,弃上清,加入 1 ml 75% 乙醇,振荡混匀,4 ℃条件下、8 000×*g* 离心 5 min。弃上清,所得沉淀即为总 mRNA。室温干燥 10 min,用 20 μl 无 RNA 酶的焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate,DEPC)水进行溶解。取少量总 mRNA 用微量紫外分光光度计测定 mRNA 的纯度和浓度。

取 600 ng 总 RNA,加入 Oligo$(dT)_{18}$ 1.0 μl,用 DEPC 水加至 12.5 μl,然后依次加入 10 mmol/L dNTP Mix 2.0 μl、5 倍 RT 缓冲液 4.0 μl、RNase 抑制剂 0.5 μl 和 RevertAid™ Reverse Transcriptase 1.0 μl,终体积为 20.0 μl。反应混合物在 42 ℃孵育 50 min,70 ℃反应 15 min 后终止反应,4 ℃保存备用。

以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,*bcl-2* 基因上游引物为 5'-TTCTTTGAGTTCGGTGGGGTC-3',下游引物为 5'-TGCATATTTGTTTGGGGCAGG-3';*GAPDH* 作为内参,上游引物为 5'-GACCACAGTCCATGACATCACT-3',下游引物为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'。反应体系:DNA 模板 1.0 μl,2 倍 SYBR qPCR Mix 10.0 μl,上下游引物各 0.5 μl,DEPC 水 8.0 μl,总体积为 20.0 μl。扩增条件:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 30 s,59 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,50 个循环。MX3000P 实时荧光定量 PCR 测定仪自行检测,以每组的空白对照组为标准化 1,自动计算实验组 mRNA 的相对表达量。

1.2.6　ELISA 法检测细胞培养液中 bcl-2 蛋白表达的变化　将细胞按 1.5×10^5/孔的密度接种于 6 孔板中培养过夜,以不同质量浓度(同 1.2.1)$ZnCl_2$ 分别处理细胞 6 h,未添加 $ZnCl_2$ 的细胞作为对照组。消化、收集细胞,PBS 洗 2 遍,用超声波细胞粉碎机粉碎细胞,4 ℃条件下、5 000×*g* 离心 5 min,收集上清,按人 bcl-2 ELISA 试剂盒说明书进行操作,用酶标仪测定各孔的 *A* 值,计算样品中 bcl-2 蛋白的表达水平。

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 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。关于细胞活性率评估的研究采用两因素干预均衡分组多水平研究设计,不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组作用不同时间细胞生存率的总体差异比较采用区组设计两因素方差分析,多重比较采用 Bonferroni 检验。不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组在不同细胞周期的细胞比例、细胞中 bcl-2 mRNA 相对表达值及其蛋白的质量分数的比较均采用单因素干预均衡分组多水平实验设计,总体差异比较均采用单因素方差分析,组间的两两比较均采用 Dunntt *t* 检验。采用双尾检验法,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　培养细胞的形态学表现

对照组 HLEB-3 细胞多呈镶嵌状多边形,细胞间连接紧密;各质量浓度 $ZnCl_2$ 处理组细胞数目均减少,细胞形态不规则,细胞间连接疏松,细胞突起减少,部分细胞漂浮。细胞形态的异常随着 $ZnCl_2$ 质量浓度的增加而更加明显(图 1)。

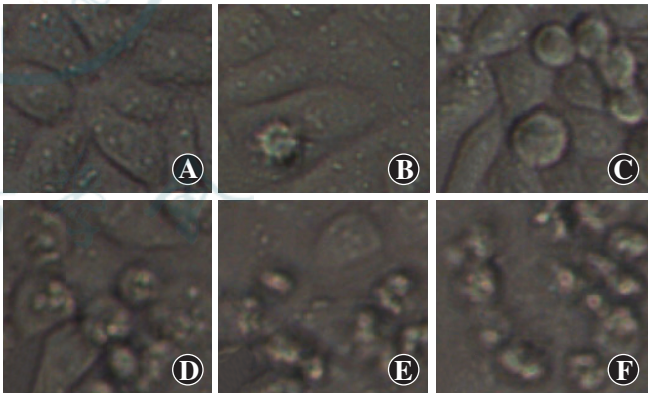

图 1　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 处理后 24 h HLEB-3 细胞的形态(×200)
A:对照组细胞形态正常　B:5 mg/L $ZnCl_2$ 组出现少量异常细胞　C:10 mg/L $ZnCl_2$ 组细胞减少　D:20 mg/L $ZnCl_2$ 组细胞减少,部分变圆　E:40 mg/L $ZnCl_2$ 组细胞绝大部分变圆,漂浮　F:80 mg/L $ZnCl_2$ 组细胞全部漂浮

2.2　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组细胞的生存率比较

随着 $ZnCl_2$ 质量浓度的增加,细胞生存率降低,差异有统计学意义($F_{质量浓度}=173.949$, $P=0.000$);随 $ZnCl_2$ 处理时间的延长,细胞生存率也随之降低,差异有统计学意义($F_{时间}=16.997$, $P=0.000$)。不同质量浓度 $ZnCl_2$ 作用于细胞后 24 h,10、20、40 和 80 mg/L $ZnCl_2$ 组细胞生存率降低,与对照组比较差异均有统计学意义($t=2.742$、6.003、58.867、76.334,均 $P<$

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

0.05)；不同质量浓度 $ZnCl_2$ 作用于细胞后 48 h 和 72 h 细胞生存率均明显降低，与对照组相比差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 1)。

表 1　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 作用不同时间细胞的生存率比较($\bar{x}\pm s$, %)

$ZnCl_2$ 质量浓度(mg/L)	样本量	不同时间点细胞生存率		
		24 h	48 h	72 h
0	3	100.00±0.00	98.12±1.26	96.62±2.51
5	3	102.19±2.33	85.89±5.61[a]	82.56±1.07[ac]
10	3	90.79±3.04[a]	80.90±5.42[b]	76.77±2.10[b]
20	3	80.22±3.31[b]	32.10±5.01[bd]	19.39±2.57[bce]
40	3	12.60±1.48[b]	1.18±0.39[bd]	0.84±0.13[bd]
80	3	7.38±1.21[b]	1.06±0.28[bd]	0.48±0.21[bde]

注：$F_{质量浓度}=173.949$, $P=0.000$; $F_{时间}=16.997$, $P=0.000$. 与各自的 0 mg/L $ZnCl_2$ 组(对照组)比较，[a]$P<0.05$，[b]$P<0.01$；与各自的 24 h 值比较，[c]$P<0.05$，[d]$P<0.01$；与各自的 48 h 值比较，[e]$P<0.05$(两因素方差分析，Bonferroni 检验)　$ZnCl_2$：氯化锌

2.3　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组细胞 ΔΨm 改变

线粒体对 JC-1 染料的摄取能力依赖于 ΔΨm 的高低。对照组细胞 ΔΨm 呈橙红色荧光；不同质量浓度 $ZnCl_2$ 处理组细胞 ΔΨm 下降，随着 $ZnCl_2$ 质量浓度的增加，橙红色荧光逐渐减弱或呈现绿色荧光(图 2)。

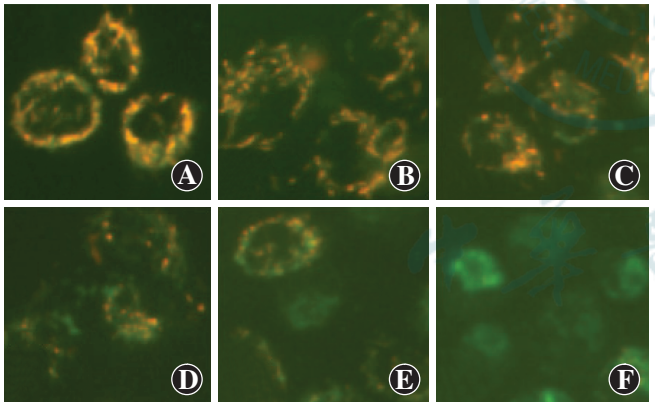

图 2　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 对细胞 ΔΨm 的影响(JC-1 ×200)　A：对照组可见细胞膜较强的橙红色荧光　B：5 mg/L $ZnCl_2$ 组细胞膜橙红色荧光减弱　C：10 mg/L $ZnCl_2$ 组可见细胞膜呈现弱橙红色荧光和弱绿色荧光　D：20 mg/L $ZnCl_2$ 组可见细胞膜极弱的橙红色荧光，绿色荧光稍增强　E：40 mg/L $ZnCl_2$ 组可见细胞膜绿色荧光增强　F：80 mg/L $ZnCl_2$ 组可见细胞膜呈强的绿色荧光

2.4　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组细胞周期的细胞比例

不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组处于 S 期和 G_2/M 期比例明显多于对照组，而 G_0/G_1 期的细胞明显少于对照组，总体差异均有统计学意义(S 期：$F=15.594$, $P=0.000$；G_2/M 期：$F=12.792$, $P=0.000$；G_0/G_1 期：$F=43.366$, $P=0.000$)。10 mg/L $ZnCl_2$ 组 G_0/G_1 期细胞比例明显低于对照组，差异有统计学意义($P<0.01$)；20 mg/L $ZnCl_2$ 组 G_0/G_1 期细胞比例明显减少，而 G_2/M 期细胞比例明显增多，与对照组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)；40 mg/L 和 80 mg/L $ZnCl_2$ 组停滞在 S 期和 G_2/M 期的细胞比例明显高于对照组，差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)(表 2)。

表 2　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组在不同细胞周期的细胞比例($\bar{x}\pm s$, %)

$ZnCl_2$ 质量浓度(mg/L)	样本量	不同细胞周期细胞比例		
		G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
0	3	65.33±6.29	13.70±3.25	22.20± 5.57
5	3	60.73±7.37	15.13±4.05	24.20± 2.36
10	3	56.33±3.01[a]	18.10±5.30	26.60± 9.68
20	3	50.30±4.97[a]	18.73±3.35	32.23± 7.12[a]
40	3	41.63±3.02[a]	25.50±2.71[a]	34.47± 6.91[a]
80	3	37.73±6.95[a]	27.97±5.72[a]	35.50±11.27[a]
F		43.366	15.594	12.792
P		0.000	0.000	0.000

注：与 0 mg/L $ZnCl_2$ 组比较，[a]$P<0.01$(单因素方差分析，Dunnett t 检验)　$ZnCl_2$：氯化锌

2.5　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组细胞中 bcl-2 mRNA 的相对表达

各组细胞中 bcl-2 mRNA 的相对表达量整体比较，差异有统计学意义($F=21.956$, $P=0.000$)。对照组细胞中 bcl-2 mRNA 的相对表达量为 1.00±0.00，5、10、20、40 和 80 mg/L $ZnCl_2$ 组 bcl-2 mRNA 的相对表达量分别降至 0.32±0.13、0.07±0.03、0.14±0.05、0.01±0.00 和 0.12±0.06，差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)(图 3)。

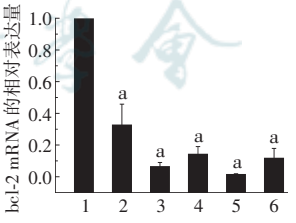

图 3　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组细胞中 bcl-2 mRNA 的相对表达量　$F=21.956$, $P=0.000$. 与 0 mg/L $ZnCl_2$ 组(对照组)比较，[a]$P<0.01$(单因素方差分析，Dunnett t 检验，$n=3$)　1：0 mg/L $ZnCl_2$ 组　2：5 mg/L $ZnCl_2$ 组　3：10 mg/L $ZnCl_2$ 组　4：20 mg/L $ZnCl_2$ 组　5：40 mg/L $ZnCl_2$ 组　6：80 mg/L $ZnCl_2$ 组　$ZnCl_2$：氯化锌

2.6　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组细胞中 bcl-2 蛋白的相对表达

对照组细胞中 bcl-2 蛋白的表达水平为(138.57±32.80)pg/mg，5、10、20、40 和 80 mg/L $ZnCl_2$ 组 bcl-2 蛋白的表达水平分别为(79.20±5.70)、(79.95±6.21)、(61.02±10.74)、(72.05±11.61)和(55.97±10.53)pg/mg，总体比较差异有统计学意义($F=10.559$, $P=0.000$)，5、10、20、40 和 80 mg/L $ZnCl_2$ 组 bcl-2 蛋白的表达水平均明显低于对照组，差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)(图 4)。

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究　Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

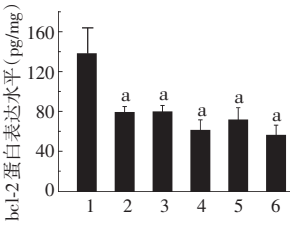

图 4　不同质量浓度 $ZnCl_2$ 组细胞中 bcl-2 蛋白的表达水平　F = 10.559, P = 0.000. 与 0 mg/L $ZnCl_2$ 组(对照组)比较, $^aP<0.01$ (单因素方差分析, Dunnett t 检验, n=3)　1:0 mg/L $ZnCl_2$ 组　2:5 mg/L $ZnCl_2$ 组　3:10 mg/L $ZnCl_2$ 组　4:20 mg/L $ZnCl_2$ 组　5:40 mg/L $ZnCl_2$ 组　6:80 mg/L $ZnCl_2$ 组　$ZnCl_2$:氯化锌

3　讨论

PCO 是白内障手术后常见的并发症,其主要治疗方法为 YAG 激光切开术,但费用较高且存在一定的手术风险和并发症[6]。PCO 的病理学基础是术后残余 LECs 的增生[7]。锌作为细胞内重要的微量元素,对肿瘤细胞的迁移和增生有调节作用。Iguchi 等[8]研究表明,将肿瘤细胞暴露于浓度为200 μmol/L 和 500 μmol/L 的锌离子中 4 ~ 8 h 可以诱导肿瘤细胞坏死和凋亡。Iitaka 等[9]的研究进一步证实,高浓度的 $ZnCl_2$ 可以直接导致癌细胞的坏死,而浓度低于 150 μmo/L 时 $ZnCl_2$ 可同时诱导癌细胞的坏死和凋亡。本研究结果表明,$ZnCl_2$ 可以抑制 HLEB-3 细胞增生,诱导细胞凋亡和坏死,其作用呈时间和剂量依赖性。

锌参与 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶和胸腺嘧啶核苷激酶等的组成,参与 DNA 合成、转录调节、细胞凋亡和细胞能量代谢等过程,具有广泛的生物学功能[10-11]。本研究细胞周期检测结果表明,$ZnCl_2$ 处理组 S 期和 G_2/M 期细胞百分比较对照组均增加,说明高质量浓度锌离子可使 HLEB-3 细胞周期阻滞在 S 期和 G_2/M 期。Jaiswal 等[12]研究发现,10 ~ 100 μmol/L $ZnCl_2$ 可显著抑制结肠癌细胞的增生,破坏细胞连接和微管稳定性,将细胞周期阻滞在 G_2/M 期,与本研究结果一致。

线粒体是细胞能量的产生和供应中心,正常的 ΔΨm 是维持线粒体功能所必需的。ΔΨm 下降提示细胞处于凋亡过程的早期阶段,线粒体功能受损,膜通透性改变,使线粒体中的凋亡因子,如细胞色素 C 等释放入细胞质,最终激活 caspase 家族介导的细胞凋亡过程[13]。JC-1 染料能特异性地与细胞线粒体内膜结合,当 ΔΨm 较高时,染料以多聚体形式存在,呈橙红色荧光;当 ΔΨm 较低时,染料以单体形式存在,呈绿色荧光。本实验结果表明,随 $ZnCl_2$ 质量浓度的升高,HLEB-3 细胞 ΔΨm 逐渐降低,细胞凋亡和坏死增多,与 MTT 法检测结果一致。

Bcl-2 家族成员在细胞凋亡的调控过程中发挥重要作用,并与 ΔΨm 的改变密切相关。Bcl-2 家族蛋白可以通过一系列相互作用保持线粒体内膜、外膜的完整性,抑制 ΔΨm 的下降,抑制线粒体基质和内外膜间隔中凋亡因子细胞色素 C 的释放,还可通过与 caspase-9 形成复合物抑制 caspase-3 的激活[14]。本实验结果表明,$ZnCl_2$ 处理 HLEB-3 细胞可降低细胞中凋亡抑制基因 *bcl-2* 的表达,引起 ΔΨm 降低,破坏了 HLEB-3 细胞能量代谢的稳定,从而促进细胞凋亡。

总之,本研究结果表明高质量浓度 $ZnCl_2$ 对体外培养人 LECs 的增生有明显的抑制作用,其作用机制可能与 $ZnCl_2$ 引起 HLEB-3 细胞周期阻滞、ΔΨm 的降低和凋亡抑制基因 *bcl-2* 的表达降低有关,但其详细机制仍需进一步研究。

参考文献

[1] Karube H, Inamura H, Matsuoka M. Zinc chloride exposure increases heme oxygenase-1 expression in MDPC-23 odontoblast-like cells[J]. Arch Oral Biol, 2013, 58(4): 355-361. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.09.002.
[2] Carter RE, Seidel JL, Lindquist BE, et al. Intracellular Zn^{2+} accumulation enhances suppression of synaptic activity following spreading depolarization[J]. J Neurochem, 2013, 125(5): 673-684. doi: 10.1111/jnc.12237.
[3] Feng P, Li TL, Guan ZX, et al. Direct effect of zinc on mitochondrial apoptogenesis in prostate cells[J]. Prostate, 2002, 52(4): 311-318. doi: 10.1002/pros.10128.
[4] Grahn BH, Paterson PG, Gottschall-Pass KT, et al. Zinc and the eye[J]. J Am Coll Nutr, 2001, 20(2 Suppl): 106-118.
[5] 庄晓东,翁景宁. 低渗刺激下晶状体上皮细胞 HLE B-3 调节性容积回缩机制的研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(4): 316-321. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.04.002.
[6] Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated[J]. Arch Ophthalmol, 2009, 127(4): 555-562. doi: 10.1001/archophthalmol.2009.3.
[7] Wormstone IM. Posterior capsule opacification: a cell biological perspective[J]. Exp Eye Res, 2002, 74(3): 337-347. doi: 10.1006/exer.2001.1153.
[8] Iguchi K, Hamatake M, Ishida R, et al. Induction of necrosis by zinc in prostrate carcinoma cells and identification of proteins increased in association with this induction[J]. Eur J Biochem, 1998, 253(3): 766-770. doi: 10.1006/exer.2001.1153.
[9] Iitaka M, Kakinuma S, Fujimaki S, et al. Induction of apoptosis and necrosis by zinc in human thyroid cancer cell lines[J]. J Endocrinol, 2001, 169(2): 417-424. doi: 10.1677/joe.0.1690417.
[10] Falchuk KH, Fawcett D, Vallee BL. Role of zinc in cell division of Euglena gracilis[J]. J Cell Sci, 1975, 17(1): 57-78.
[11] Park KS, Lee NG, Lee KH, et al. The ERK pathway involves positive and negative regulations of HT-29 colorectal cancer cell growth by extracellular zinc[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 285(6): G1181-1188. doi: 10.1152/ajpgi.00047.2003.
[12] Jaiswal AS, Narayan S. Zinc stabilizes adenomatous polyposis coli (APC) protein levels and induces cell cycle arrest in colon cancer cells[J]. J Cell Biochem, 2004, 93(2): 345-357. doi: 10.1002/jcb.20156.
[13] Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, et al. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: A possible mechanism responsible for antiapoptotic effects of melatonin[J]. FASEB J, 2004, 18(7): 869-871. doi: 10.1096/fj.03-1031 fje.
[14] Green DR, Evan GI. A matter of life and death[J]. Cancer Cell, 2002, 1(1): 19-30.

(收稿日期:2014-08-27)

(本文编辑:尹卫靖　杜娟)

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?