

· 实验研究 ·

TGF- β /WNT5a/JNK 信号通路对人晶状体上皮细胞上皮-间充质转化的促进作用

宋宇¹ 包秀丽²¹内蒙古医科大学第一临床医学院, 呼和浩特 010050; ²内蒙古医科大学附属医院眼科, 呼和浩特 010050

宋宇现在北京市延庆区医院(北京大学第三医院延庆医院)眼科, 北京 102100

通信作者: 包秀丽, Email: ophbaxili@hotmail.com

【摘要】 目的 研究转化生长因子 β /无翅蛋白 5a/c-Jun N-氨基末端激酶(TGF- β /WNT5a/JNK)信号通路对晶状体上皮细胞(LECs)纤维化的影响。方法 将人 LECs 细胞系 SRA01/04 分为对照组、TGF- β 组和 WNT5a 组,其中对照组细胞常规培养,TGF- β 组和 WNT5a 组分别采用 TGF- β_1 和 WNT5a 处理 24 h。采用 Western blot 法检测 3 个组细胞 WNT5a、JNK、磷酸化 JNK(p-JNK)蛋白的相对表达量。另将细胞系分为对照组、TGF- β 组、TGF- β +SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组,其中对照组细胞常规培养,TGF- β 组、TGF- β +SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组分别采用 TGF- β_1 处理 24 h、TGF- β_1 处理 24 h+JNK 抑制剂 SP600125 处理 2 h、WNT5a 处理 24 h+SP600125 处理 2 h。采用 Western blot 法检测 4 个组细胞 WNT5a、JNK、p-JNK、I 型胶原蛋白(Col-I)、纤维连接蛋白(FN)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的相对表达量;采用免疫荧光染色法检测各组细胞 α -SMA 的表达分布;采用 Transwell 小室实验检测各组细胞相对迁移数;采用 Col-I 凝胶收缩实验检测各组细胞培养 8、16、24 和 48 h 时 Col-I 凝胶面积比率。结果 Western blot 结果显示,TGF- β 组和 WNT5a 组细胞 WNT5a、JNK、p-JNK 蛋白相对表达量均明显高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。TGF- β 组、TGF- β +SP600125 组、WNT5a+SP600125 组细胞 Col-I、FN、 α -SMA 的蛋白相对表达量明显高于对照组,TGF- β +SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组细胞各蛋白相对表达量明显低于 TGF- β 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。免疫荧光染色结果显示,TGF- β 组 SRA01/04 细胞由柱状的上皮细胞转分化为纺锤状的肌成纤维细胞,TGF- β +SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组细胞仍以柱状上皮细胞形态居多。TGF- β 组、TGF- β +SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组细胞内 α -SMA 相对荧光染色强度明显高于对照组,TGF- β +SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组 α -SMA 相对免疫荧光强度明显低于 TGF- β 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Transwell 小室迁移实验结果显示,TGF- β 组细胞相对迁移数明显高于对照组,TGF- β +SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组细胞相对迁移数明显低于 TGF- β 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Col-I 胶原凝胶收缩实验结果显示,随着培养时间的延长,各组细胞 Col-I 凝胶面积明显减小。各组不同时间点 Col-I 凝胶面积比率总体比较,差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 71.604, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 71.599, P < 0.001$);培养 48 h 时,TGF- β 组、TGF- β +SP600125 和 WNT5a+SP600125 组细胞 Col-I 凝胶面积比率分别为(26.24 \pm 0.28)%、(64.02 \pm 1.05)%、(76.81 \pm 0.28)%,明显低于对照组的(90.20 \pm 0.31)%,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 WNT5a/JNK 信号通路作为 TGF- β 信号通路下游作用靶点,促进了 LECs 上皮-间充质转化及细胞外基质沉积,提高了细胞收缩力。

【关键词】 晶状体上皮细胞; c-Jun N-氨基末端激酶; 转化生长因子- β ; 无翅蛋白 5a; 上皮-间充质转化; 纤维化

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2019MS08116); 内蒙古医科大学面上项目(YKD2022MS021)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230425-00147

Promotive effect of the TGF- β /WNT5a/JNK signaling pathway on the epithelial-mesenchymal transition in human lens epithelial cells

Song Yu¹, Bao Xiuli²

¹First Clinical Medical College of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

Song Yu now works at the Department of Ophthalmology, Beijing Yanqing District Hospital (Yanqing Hospital of Peking University Third Hospital), Beijing 102100, China

Corresponding author: Bao Xiuli, Email: ophbaxili@hotmail.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of the transforming growth factor- β /Wingless 5a/c-Jun N-terminal kinase (TGF- β /WNT5a/JNK) signaling pathway on fibrosis of lens epithelial cells (LECs). **Methods** The human LECs line SRA01/04 was divided into three groups, control group cultured with conventional medium, TGF- β group treated with TGF- β 1 for 24 hours and WNT5a group treated with WNT5a for 24 hours. Western blot was performed to detect the relative protein expression levels of WNT5a, JNK, and phosphorylated JNK (p-JNK) in cells of the three groups. The SRA01/04 cell line was further divided into four groups, control group cultured with conventional medium, TGF- β group treated with TGF- β 1 for 24 hours, TGF- β +SP600125 group treated with TGF- β 1 for 24 hours+JNK inhibitor SP600125 for 2 hours, and WNT5a+SP600125 group treated with WNT5a for 24 hours+SP600125 for 2 hours. The relative expression of WNT5a, JNK, p-JNK, type I collagen (Col-I), fibronectin (FN), and α -smooth muscle actin (α -SMA) in cells of the four groups was detected by Western blot. The distribution of α -SMA in cells was determined by immunofluorescence staining. Cell migration was evaluated via Transwell assay, and Col-I gel area ratio was measured at 8, 16, 24, and 48 hours of culture by gel contraction experiment. **Results** Western blot revealed that the relative protein expression levels of WNT5a, JNK, and p-JNK were significantly higher in the TGF- β and WNT5a groups than in the control group (all $P < 0.05$). The expression levels of Col-I, FN, and α -SMA were significantly higher in the TGF- β , TGF- β +SP600125, and WNT5a+SP600125 groups than in the control group and significantly lower in the TGF- β +SP600125 and WNT5a+SP600125 groups than in the TGF- β group (all $P < 0.05$). Immunofluorescence staining showed that TGF- β -treated SRA01/04 cells transformed from columnar epithelial cells to spindle-shaped myofibroblasts in TGF- β group, whereas most cells in the TGF- β +SP600125 and WNT5a+SP600125 groups were still columnar epithelial cells. The relative fluorescence intensity of α -SMA was significantly higher in the TGF- β , TGF- β +SP600125 and WNT5a+SP600125 groups than in the control group, and the relative fluorescence intensity of α -SMA was significantly lower in the TGF- β +SP600125 and WNT5a+SP600125 groups than in the TGF- β group (all $P < 0.05$). Transwell assay showed that there were more migrating cells in TGF- β group than in the control group, and the migrating cell count was lower in TGF- β +SP600125 group and WNT5a+SP600125 group than in the control group, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). Col-I gel contraction experiment results showed that with the extension of culture time, the Col-I gel area in each group decreased significantly, with significant overall comparison differences in the Col-I gel area shrinkage ratios in each group at different time points ($F_{\text{time}} = 71.599, P < 0.001$) and among different groups ($F_{\text{group}} = 71.604, P < 0.001$). After 48 hours of culture, the Col-I gel shrinkage ratios in TGF- β group, TGF- β +SP600125 and WNT5a+SP600125 groups were (26.24 \pm 0.28)%, (64.02 \pm 1.05)%, and (76.81 \pm 0.28)%, respectively, which were significantly lower than (90.20 \pm 0.31)% of the control group (all $P < 0.05$). **Conclusions** The WNT5a/JNK signaling pathway, acting as a downstream target of the TGF- β signaling pathway, promotes epithelial-mesenchymal transition and extracellular matrix deposition in LECs, and enhances cell contractility.

[Key words] Lens epithelial cells; c-Jun N-terminal kinase; Transforming growth factor- β ; Wingless 5a; Epithelial mesenchymal transition; Fibrosis

Fund program: Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2019MS08116); General Program of Inner Mongolia Medical University (YKD2022MS021)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20230425-00147

白内障是常见的全球性致盲眼病之一,预计到2050年我国45~89岁人群的白内障患病率将占白内障患病总人群的33.34%^[1]。手术是白内障的主要治疗手段。后发性白内障 (posterior capsular opacification, PCO) 是白内障术后常见的远期并发症,随着手术技术和人工晶状体的改良,PCO的发病率已有所下降,但术后2个月~5年成人和儿童PCO的总

发病率分别高达50%和100%^[2]。PCO的形成与囊膜下残留晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 的增殖、迁移及上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 密切相关。WNT信号通路是促进脊椎动物胚胎正常发育和维持成体组织内稳态的重要途径, WNT蛋白通过配体-受体结合,激活受体胞内结构域,将胞外信号转换为胞内反应。根据是否依赖 β -连

环蛋白, WNT 信号通路分为经典和非经典信号通路, 后者包括 WNT/c-Jun N 末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、WNT/Ca²⁺ 通路^[3]。大量体内外研究已证实, 经典 WNT 信号异常激活与 PCO 直接相关, 而非经典 WNT 信号在 PCO 中的作用机制却鲜有研究。WNT/JNK 通过非经典 WNT 蛋白与 RAR 相关孤儿受体 2、Vangl 蛋白 2 和卷曲蛋白 7 (frizzled 7, FZD7) 复合物结合, 激活蓬乱蛋白介导的 JNK、Rho/Rac GTP 酶、Rho 激酶信号, 促进转录因子激活蛋白 1 和转录激活因子 2 的表达, 从而调节细胞生物学行为^[3-4]。在转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 诱导的 LECs EMT 和白内障发生过程中, 非经典 WNT 信号配体无翅蛋白 5a (Wingless 5a, WNT5a)、受体 FZD2 等有所上调^[5]。但 WNT/JNK 信号是否在 LECs 纤维化中起作用尚不清楚。本研究拟探索 WNT/JNK 信号通路对 LECs 纤维化的影响, 以期为 PCO 的药物防治提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人 LECs 细胞系 SRA01/04 购自中国医学院肿瘤细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素溶液 (美国 Gibco 公司); 3% 牛血清白蛋白 (bovine albumin, BSA)、荧光素偶联山羊抗小鼠 IgG (A32723)、Western blot 检测盒 (美国 Thermo Fisher 公司); 重组人 TGF- β_1 蛋白 (P01137)、重组人 WNT5a 蛋白 (P22725)、小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 单克隆抗体 (MAB1420)、兔抗 JNK 多克隆抗体 (AF1205) (美国 D&R System 公司); 兔抗 WNT5a 多克隆抗体 (ab153876)、兔抗纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 单克隆抗体 (ab199056)、JNK 抑制剂 SP600125、小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 单克隆抗体 (ab181602)、兔抗 WNT5a 多克隆抗体 (ab153876)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔 IgG (ab97051)、HRP 兔抗小鼠 IgG (ab6728) (美国 Abcam 公司); 兔抗磷酸化 JNK (p-JNK) 多克隆抗体 (9251)、兔抗 I 型胶原蛋白 (type I collagen, Col-I) 多克隆抗体 (42818) (美国 Cell Signaling Technology 公司); BCA 蛋白试剂盒 (美国 Pierce 公司); 电化学发光液 (美国 Millipore 公司); I 型鼠尾胶原 (美国 Corning 公司); 细胞收缩检测试剂盒 (美国 Cell Biolabs 公司)。

激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); BS-300 型全自动生化分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); 化学发光检测系统 (美国 Tanon 公司); DYY-11 型多用电泳仪 (北京六一仪器厂); MCO-175 型 CO₂ 培养箱 (日本三洋集团); 光学倒置显微镜 (IMF413, 日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞体外培养 SRA01/04 细胞在含 10% FBS、100 U/ml (商品单位) 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养, 每天换液。当细胞融合达 80% 时, 加入 1 ml 胰蛋白酶消化液于 37 °C 培养箱内消化 2 min, 按 1:4 比例传代培养。取第 5~7 代细胞进行后续实验。

1.2.2 实验分组 将细胞接种至 6 孔板中, 分为 TGF- β 组、WNT5a 组和对照组 3 个组, 分别采用 2 ng/ml TGF- β_1 、5 ng/ml WNT5a 和常规培养基培养 24 h。重复接种新培养的细胞至 6 孔板中, 分为 4 个组, 其中 TGF- β 组细胞采用 2 ng/ml TGF- β_1 诱导 24 h; TGF- β + SP600125 组细胞采用 2 ng/ml TGF- β_1 诱导 24 h 后加入 10 μ mol/L JNK 抑制剂 SP600125 继续处理 2 h; WNT5a + SP600125 组细胞采用 5 ng/ml WNT5a 诱导 24 h 后加入 10 μ mol/L SP600125 继续处理 2 h; 对照组细胞常规培养 24 h。

1.2.3 Western blot 法检测 各组细胞中 WNT5a、JNK、p-JNK、Col-I、FN 及 α -SMA 蛋白表达量 取各组细胞, 预冷 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 100 μ l 预冷 SDS 裂解液, 4 °C 下 12 000 \times g 离心 15 min, 取上清获得细胞总蛋白, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明测定蛋白总浓度。选取 35~50 μ g 蛋白上样到新配制的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 并转印至 PVDF 膜。室温下将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中摇动封闭 1 h, TBS 洗涤 3 次; 加入 WNT5a、JNK、p-JNK、 α -SMA、FN、Col-I 和 GAPDH 抗体 (均 1:1 000 稀释) 于 4 °C 下孵育过夜; TBS 洗膜后与相应的 HRP 标记二抗 (均 1:5 000 稀释) 室温振荡孵育 2 h; ECL 法显影, 于暗室曝光并采用 Tanon 5200 化学发光成像仪进行拍照, 采用 ImageJ 软件进行灰度分析, 以 GAPDH 为内参照, 计算各目的蛋白的相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.2.4 免疫荧光染色法检测 各组细胞中 α -SMA 表达分布 取各组细胞, 以 1 \times 10⁴/ml 的密度接种于含玻片的 24 孔培养板中, 置于培养箱中培养 1~2 d, 取出细胞爬片, 用预热的 pH 7.4 PBS 洗涤 2 次, 加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次; 用 50 mmol/L NH₄Cl 中和游离的多聚甲醛 10 min, PBS 洗涤 3 次, 0.2% TritonX-100 室

温透膜 5 min, PBS 洗涤 3 次; 加入 3% BSA 室温下封闭 30 min; 加入 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -SMA 抗体(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 振荡洗涤 3 次; 加入荧光素偶联二抗(1:5 000) 室温下孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次; 加入 DAPI 避光孵育 5 min, PBS 洗涤 3 次, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片。采用激光扫描共聚焦显微镜观察并拍照, 采用 ImageJ 软件分析各组细胞 α -SMA 相对荧光强度。实验独立重复 3 次。

1.2.5 Transwell 小室实验检测各组细胞迁移情况

将 8 μm 孔径 Transwell 小室置于 24 孔板, 上层加入 0.05% BSA 培养基, 下层加入 20% FBS 培养基。分别取各组对数生长期的细胞, 弃去培养基, PBS 洗涤 3 次, 加入胰蛋白酶消化至部分细胞呈球状, 加入培养基轻轻振荡终止消化, 吸出剩余培养基, PBS 洗涤后用无血清培养基重悬, 调整细胞密度为 5×10^5 个/ml。取 200 μl 重悬细胞加入上室聚碳酸酯膜上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 48 h。取出小室, 棉签轻拭聚碳酸酯膜表面的细胞, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 洗涤细胞 3 次, 脱色, 风干后在 10 倍视野显微镜下任意选取 5 个视野观察并计数。实验独立重复 3 次。

1.2.6 Col- I 凝胶收缩实验检测各组细胞胶原凝胶收缩情况

取 1% BSA 覆盖 24 孔板以孵育胶原凝胶, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培育 1 h, 避免凝胶与培养皿接触。将 I 型鼠尾胶原配制成 2 mg/ml 中和胶原混合液。分别将 4 个组细胞用胰蛋白酶消化后用无血清 DMEM/F12 培养液重悬细胞并计数, 将细胞悬液接种于 Col- I 溶液中, 调整细胞密度为 2.5×10^5 个/ml, 每孔 0.5 ml 加入 24 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 1 h; 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 温箱中培育, 分别于 8、16、24 和 48 h 监测胶原凝胶收缩情况。采用 ImageJ 软件分析胶原凝胶面积, 计算各时间点胶原凝胶面积比率。各时间点胶原凝胶收缩面积比率 = 各时间点凝胶面积/初始凝胶面积。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析。计量数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间经 Levene 检验证实方差齐。各组细胞 WNT5a、JNK、p-JNK、Col- I、FN、 α -SMA 蛋白相对表达量、相对细胞迁移数总体比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。各组细胞不同时间点胶原凝胶收缩面积比率比较采用重复测量两因素方差分析, 组间多重比较采用 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 TGF- β 组、WNT5a 组和对照组细胞 WNT5a、JNK、p-JNK 蛋白表达情况比较

Western blot 结果显示, TGF- β 组和 WNT5a 组细胞 WNT5a 和 p-JNK 蛋白条带强度明显强于对照组(图 1)。3 个组细胞 WNT5a、JNK 和 p-JNK 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 1\ 417.027$ 、 $1\ 855.444$ 、 817.986 , 均 $P < 0.05$), 其中 TGF- β 组和 WNT5a 组细胞 WNT5a、JNK 和 p-JNK 蛋白相对表达量均高于对照组, WNT5a 组各蛋白相对表达量均高于 TGF- β 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 1)。

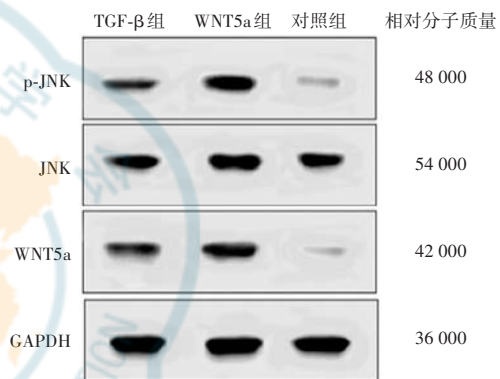


图 1 TGF- β 组、WNT5a 组和对照组细胞 WNT5a、JNK 和 p-JNK 蛋白表达电泳图 TGF: 转化生长因子; WNT5a: 无翅蛋白 5a; p-JNK: 磷酸化 JNK; JNK: c-Jun N-氨基末端激酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 1 Electrophoretogram of WNT5a, JNK and p-JNK proteins expression in cells of TGF- β group, WNT5a group and control group TGF: transforming growth factor; WNT5a: Wingless 5a; p-JNK: phosphorylated JNK; JNK: c-Jun N-amino terminal kinase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 1 各组细胞 WNT5a、JNK 和 p-JNK 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of expression of WNT5a, JNK and p-JNK proteins among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	WNT5a	JNK	p-JNK
对照组	3	1.000 \pm 0.000	1.000 \pm 0.000	1.000 \pm 0.000
TGF- β 组	3	4.330 \pm 0.045 ^a	1.306 \pm 0.008 ^a	3.471 \pm 0.093 ^a
WNT5a 组	3	5.257 \pm 0.173 ^{ab}	1.448 \pm 0.015 ^{ab}	4.170 \pm 0.148 ^{ab}
<i>F</i> 值		1 417.027	1 855.444	817.986
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.001

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 TGF- β 组相比, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) WNT5a: 无翅蛋白 5a; JNK: c-Jun N-氨基末端激酶; p-JNK: 磷酸化 JNK; TGF: 转化生长因子

Note: Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with TGF- β group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) WNT5a: Wingless 5a; JNK: c-Jun N-amino terminal kinase; p-JNK: phosphorylated JNK; TGF: transforming growth factor

2.2 各组细胞 Col-I、FN 和 α-SMA 蛋白表达情况比较

Western blot 结果显示, TGF-β 组、TGF-β + SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组细胞 Col-I、FN 和 α-SMA 蛋白条带灰度强于对照组, TGF-β + SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组细胞 3 种蛋白条带灰度明显弱于 TGF-β 组(图 2)。4 个组 Col-I、FN 和 α-SMA 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 149.474, 618.478, 185.882$, 均 $P < 0.001$), 其中 TGF-β 组细胞 Col-I、FN 和 α-SMA 蛋白相对表达量均高于 TGF-β+SP600125 组、WNT5a+SP600125 组和对照组, TGF-β+SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组各蛋白相对表达量均高于对照组, TGF-β+SP600125 组各蛋白相对表达量均高于 WNT5a+SP600125 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 2)。

2.3 各组细胞 α-SMA 蛋白表达分布比较

与对照组相比, TGF-β 组细胞由柱状的上皮细胞变为梭形的间质细胞。TGF-β 组、TGF-β + SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组细胞 α-SMA 广泛分布在细胞核周边及细胞质中。TGF-β 组、TGF-β + SP600125 组、WNT5a+SP600125 组和对照组 α-SMA 相对免疫荧光强度分别为 $53.627 \pm 3.067, 42.083 \pm 1.744, 22.743 \pm 1.635, 0.000 \pm 0.000$, 总体比较差异有统计学意义($F = 438.209, P < 0.001$), 其中 TGF-β 组、TGF-β + SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组细胞 α-SMA 相对免疫荧光强度均明显高于对照组, TGF-β 组细胞 α-SMA 相对免疫荧光强度明显高于 TGF-β+SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组, TGF-β+SP600125 组细胞 α-SMA 相对免疫荧光强度明显高于 WNT5a + SP600125 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 3)。

2.4 各组细胞迁移情况比较

Transwell 小室迁移实验结果显示, TGF-β 组、TGF-β + SP600125 组、WNT5a+SP600125 组和对照组细胞相对迁移数分别为 $4.86 \pm 0.14, 2.86 \pm 0.14, 2.29 \pm 0.14, 1.00 \pm 0.14$, 总体比较差异有统计学意义($F = 378.750, P < 0.001$), 其中 TGF-β 组、TGF-β + SP600125 组和 WNT5a + SP600125 组细胞相对迁移数均明显高于对照组, TGF-β 组细胞相对迁移数明显高于 TGF-β+SP600125 组和 WNT5a + SP600125 组, TGF-β+SP600125 组细胞相对迁移数高于 WNT5a+SP600125 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 4)。

2.5 各组细胞 Col-I 凝胶面积变化情况比较

Col-I凝胶收缩实验结果显示,随着培养时间的延长,各组 Col-I凝胶面积逐渐缩小,培养 48 h 时, TGF-β 组、TGF-β + SP600125 组和 WNT5a + SP600125 组细胞 Col-I凝胶面积明显小于对照组, TGF-β+SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组细胞 Col-I 凝胶面积明显大于 TGF-β 组(图 5)。各时间点 4 个组细胞 Col-I 凝胶面积比率总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 71.604, P < 0.001$), 其中各培养时间点 TGF-β 组细胞 Col-I 凝胶面积比率低于对照组、TGF-β+SP600125 组和 WNT5a+SP600125 组, TGF-β + SP600125 组低于对照组和 WNT5a+SP600125 组, WNT5a+SP600125 组低于对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 不同时间点各组细胞 Col-I 凝胶面积比率总体比较差异有统计学意义($F_{\text{时间}} = 71.599, P < 0.001$)(表 3)。

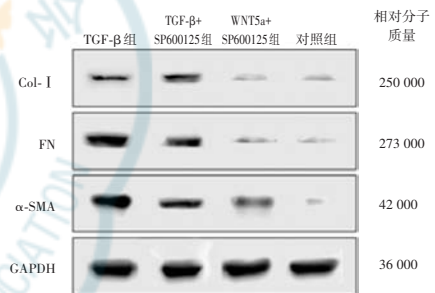


图 2 TGF-β 组、TGF-β+SP600125 组、WNT5a+SP600125 组和对照组 Col-I、FN、α-SMA 蛋白表达电泳图 Col-I: I 型胶原蛋白; FN: 纤维连接蛋白; α-SMA: α-平滑肌肌动蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 2 Electrophoretogram of Col-I, FN and α-SMA proteins expression in cells from TGF-β group, WNT5a group and control group Col-I: type I collagen; FN: fibronectin; α-SMA: α-smooth muscle actin; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 2 各组细胞 Col-I、FN、α-SMA 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of expression of Col-I, FN and α-SMA proteins among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Col-I	FN	α-SMA
对照组	3	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
TGF-β 组	3	12.202±0.950 ^a	22.566±0.893 ^a	12.997±0.826 ^a
TGF-β+SP600125 组	3	8.732±0.624 ^{ab}	11.445±0.821 ^{ab}	8.080±0.777 ^{ab}
WNT5a+SP600125 组	3	2.900±0.926 ^{abc}	2.884±0.638 ^{abc}	6.248±0.547 ^{abc}
F 值		149.474	618.478	185.882
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, ^a $P < 0.05$;与 TGF-β 组相比, ^b $P < 0.05$;与 TGF-β+SP600125 组相比, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) Col-I: I 型胶原蛋白; FN: 纤维连接蛋白; α-SMA: α-平滑肌肌动蛋白; TGF: 转化生长因子; WNT5a: 无翅蛋白 5a

Note: Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with TGF-β group, ^b $P < 0.05$; compared with TGF-β+SP600125 group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) Col-I: type I collagen; FN: fibronectin; α-SMA: α-smooth muscle actin; TGF: transforming growth factor; WNT5a: Wingless 5a

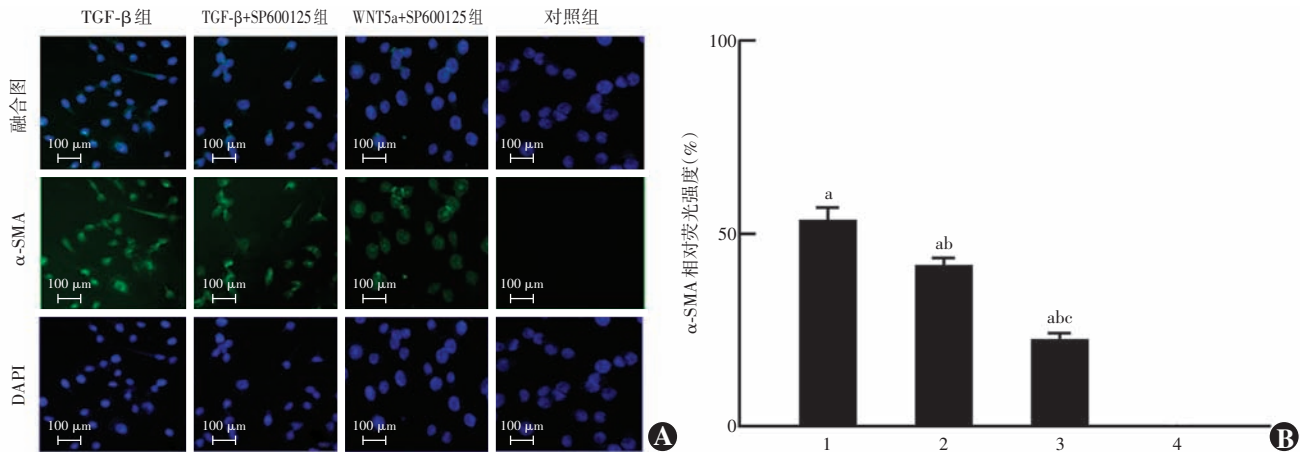


图 3 免疫荧光法检测各组细胞中 α-SMA 的表达 A: 各组细胞免疫荧光图(×100, 标尺=100 μm) 细胞核呈蓝色荧光(DAPI), α-SMA 呈绿色荧光(FITC) B: 各组细胞 α-SMA 相对荧光强度比较 $F=438.209, P<0.001$. 与对照组相比, ^a $P<0.05$; 与 TGF-β 组相比, ^b $P<0.05$; 与 TGF-β+SP600125 组相比, ^c $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验; $n=3$) 1: TGF-β 组; 2: TGF-β+SP600125 组; 3: WNT5a+SP600125 组; 4: 对照组; TGF: 转化生长因子; WNT5a: 无翅蛋白 5a; α-SMA: α-平滑肌肌动蛋白; DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚

Figure 3 Expression of α-SMA in SRA0104 cells in different groups detected by immunofluorescence assay A: Immunofluorescence map of different groups (×100, scale bar=100 μm) Nuclei showed blue fluorescence (DAPI) and α-SMA showed green fluorescence (FITC) B: Comparison of the relative fluorescence intensity of α-SMA in cells among different groups $F=438.209, P<0.001$. Compared with control group, ^a $P<0.05$; compared with TGF-β group, ^b $P<0.05$; compared with TGF-β+SP600125 group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test; $n=3$) 1: TGF-β group; 2: TGF-β+SP600125 group; 3: WNT5a+SP600125 group; 4: control group; TGF: transforming growth factor; WNT5a: Wingless 5a; α-SMA: α-smooth muscle actin; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

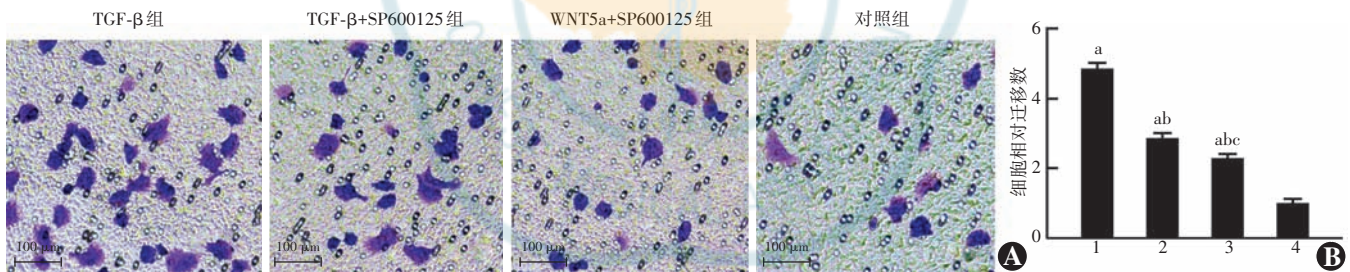


图 4 Transwell 小室实验检测各组细胞迁移情况 A: 光学显微镜下各组细胞迁移情况(×100, 标尺=100 μm) B: 各组细胞相对迁移数比较 $F=378.750, P<0.001$. 与对照组相比, ^a $P<0.05$; 与 TGF-β 组相比, ^b $P<0.05$; 与 TGF-β+SP600125 组相比, ^c $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验; $n=3$) 1: TGF-β 组; 2: TGF-β+SP600125 组; 3: WNT5a+SP600125 组; 4: 对照组 TGF: 转化生长因子; WNT5a: 无翅蛋白 5a

Figure 4 Migration of SRA01/04 cells in different groups detected by Transwell assay A: Migration of cells under an optical microscope (×100, scale bar=100 μm) B: Comparison of migrating cell count among different groups $F=378.750, P<0.001$. Compared with control group, ^a $P<0.05$; compared with TGF-β group, ^b $P<0.05$; compared with TGF-β+SP600125 group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test; $n=3$) 1: TGF-β group; 2: TGF-β+SP600125 group; 3: WNT5a+SP600125 group; 4: control group TGF: transforming growth factor; WNT5a: Wingless 5a

3 讨论

PCO 是白内障术后患者视力下降的主要原因之一, 可导致对比敏感度降低、眩光和复视, 严重影响患者生活质量。PCO 分为纤维性 PCO 和再生性 PCO, 前者与细胞过度增殖、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积收缩、细胞 EMT 有关, 遵循经典的纤维化过程, 后者主要表现为晶状体囊袋周围 Soemmerring 环和 Elschnig 珍珠, 与晶状体纤维细胞的分化有关^[3]。多种分子信号, 如 TGF-β 信号通路、WNT 信号通路等参与 PCO 的形成^[6]。应激、炎症因子、G 蛋白受体激动剂和促生长因子等通过胶原三螺旋重复序列包含蛋

白 1 增强细胞膜上 Rho 家族小 GTP 酶活性, 诱导膜近端蛋白丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAP3Ks) 的激活, 磷酸化丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4, MKK4) 和 MKK7, MKK7 进一步磷酸化并激活 JNK。活化的 JNK 激活转录因子激活蛋白 1 等下游分子, 调控细胞增殖、分化、迁移、细胞自噬和凋亡, 参与细胞纤维化^[7-8]。WNT5a 与 FZD 受体结合激活 JNK, 促进 TGF-β 诱导的 ECM 沉积。抑制 WNT/JNK 可减弱 TGF-β 对 WNT5a 的激活, 减少细胞 EMT 和 ECM 沉积, 抑制纤维化^[9-11]。

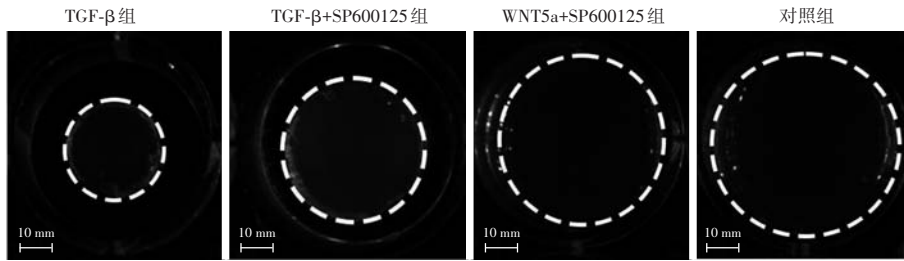


图 5 各组细胞培养 48 h 胶原收缩情况 (标尺 = 10 mm) TGF: 转化生长因子; WNT5a: 无翅蛋白 5a

Figure 5 Collagen contraction of cells in different groups (scale bar=10 mm) TGF: transforming growth factor; WNT5a: Wingless 5a

表 3 各组细胞不同时间点 Col- I 凝胶面积比率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 3 Comparison of Col- I gel area ratio of cells among different groups at different time points ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	不同时间点 Col- I 凝胶面积比率			
		8 h	16 h	24 h	48 h
对照组	3	96.70±0.30	95.94±0.35	95.09±0.91	90.20±0.31
TGF-β 组	3	75.92±0.61 ^a	66.65±0.72 ^a	49.97±0.69 ^a	26.24±0.28 ^a
TGF-β+SP600125 组	3	84.61±0.86 ^{ab}	83.72±0.22 ^{ab}	74.54±0.64 ^{ab}	64.02±1.05 ^{ab}
WNT5a+SP600125 组	3	91.78±0.64 ^{abc}	86.98±0.42 ^{abc}	84.90±0.25 ^{abc}	76.81±0.28 ^{abc}

注: $F_{\text{分组}} = 71.604, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 71.599, P < 0.001$. 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 TGF-β 组相比, ^b $P < 0.05$; 与 TGF-β+SP600125 组相比, ^c $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验)
Col- I: I 型胶原蛋白; TGF: 转化生长因子; WNT5a: 无翅蛋白 5a
Note: $F_{\text{group}} = 71.604, P < 0.001; F_{\text{time}} = 71.599, P < 0.001$. Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with TGF-β group, ^b $P < 0.05$; compared with TGF-β + SP600125 group, ^c $P < 0.05$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD-*t* test) Col- I: type I collagen; TGF: transforming growth factor; WNT5a: Wingless 5a

在纤维化疾病中, TGF-β 信号和非经典 WNT 信号激活相同的丝裂原活化蛋白 (mitogen-activated protein, MAPK) 通路, 提示 JNK 与 TGF-β、WNT 信号紧密相连, 共同促进组织器官纤维化^[12]。细胞 EMT 和 ECM 沉积是纤维化的重要病理过程。Ras/TGF-β 可促进细胞 WNT5a/PCP (WNT/JNK) 激活, 诱导细胞 EMT 发生^[13]。WNT5a/JNK₁ 通过磷酸化 Paxillin、促进基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinases 1, MMP1)、MMP2、细胞黏附因子 1 和 CD44 的表达, 上调波形蛋白和 α-SMA 的表达, 降低 E-钙黏蛋白水平, 诱导胰腺癌细胞 EMT, 促进细胞迁移^[9]。非经典 WNT 蛋白与 FZD 受体结合上调 MMP7 的表达, 促进角膜上皮细胞迁移^[14]。在敲除了 II 型 TGF-β 受体 (TBR-II) 的 Tbr2^{ceΔ/ceΔ} 小鼠中, TGF-β 信号通路的异常可抑制 JNK 信号通路对角膜上皮细胞迁移力的促进作用, 抑制角膜上皮的损伤修复^[15]。PCO 发生时, LECs 转分化为肌成纤维细胞获得强迁移力, 由晶状体囊袋赤道部游移至后囊下, 形成瘢痕遮挡光学区^[16-17]。α-SMA 是肌成纤维细胞的标志物之一, 参与细胞骨架的重塑,

促进细胞迁移和收缩^[18]。本研究发现, TGF-β 刺激 LECs 中 α-SMA 蛋白表达显著增加, 细胞转分化为肌成纤维细胞, 抑制 JNK 磷酸化可有效下调细胞内 α-SMA 蛋白表达水平, 阻断细胞 EMT, 抑制细胞迁移。

成纤维细胞、肌成纤维细胞分泌 Col- I、Col- III 和 FN 等 ECM 主要成分^[19]。在细胞纤维化中存在大量不同类型的胶原蛋白, 其中 Col- I 为主要成分^[19]。WNT 蛋白可诱导 LECs 中 Col- I 的表达, 同时促进细胞收缩及瘢痕形成^[20]。WNT5a 与 LECs 的迁移、分化和 ECM 重构密切相关^[21]。WNT5a 与 FZD8 受体结合, 激活 JNK 并诱导 T 细胞核因子活化和核转位, 促进 TGF-β 诱导的 ECM 沉积。抑制 WNT/JNK 可减弱 TGF-β 诱导的 Col 和 FN 表达, 逆转纤维化^[22]。本研究表明, TGF-β 促进 LECs 中 Col- I 和 FN 合成, 促进 ECM 沉积, 抑制 JNK 磷酸化可有效抑制细胞 Col-

I、FN 的表达, 减少 ECM 沉积, 阻断 LECs 纤维化发生。

本课题组前期实验表明, 沉默 WNT5a 表达后, TGF-β 诱导的 LECs 纤维化得到显著抑制。WNT5a 可作为 TGF-β₁ 的下游作用位点, 刺激肌成纤维细胞内 Col、FN、波形蛋白表达, 刺激 ECM 形成, 诱导组织纤维化, 沉默 WNT5a 可抑制 TGF-β 诱导的 ECM 沉积^[10]。本研究结果也表明, TGF-β 组细胞内 Col- I、FN 和 α-SMA 表达显著增加的同时伴 WNT5a、JNK、p-JNK 的蛋白水平上调, 经 JNK 抑制剂处理的细胞内 Col- I、FN 和 α-SMA 表达显著降低, 提示 WNT/JNK 信号通路参与 TGF-β 诱导的 LECs EMT 和 ECM 沉积。然而, 本研究也存在一定的局限性, 即仅分析了单一 SRA0104 细胞系在 TGF-β/WNT5a/P-JNK 信号轴诱导下的细胞变化。JNK 信号通路在其他 LECs 细胞系和动物晶状体中对纤维化影响的确切机制有望成为下一步研究方向。

综上所述, 本实验探索了 TGF-β/WNT5a/JNK 信号轴对 LECs EMT 和纤维化的促进作用, WNT5a/JNK

信号通路可作为 TGF- β 信号通路下游作用靶点诱导 LECs EMT, 提高细胞迁移力, 促进细胞 Col- I、FN、 α -SMA 的表达, 促进 ECM 沉积, 提高细胞收缩力, 进而促进 PCO 的形成。JNK 信号通路可能为 PCO 的药物防治靶点提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 宋宇: 实施研究、采集数据、分析/解释数据、统计分析、起草文章; 包秀丽: 酝酿和设计实验、实施研究、指导研究、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿

参考文献

- [1] Song P, Wang H, Theodoratou E, et al. The national and subnational prevalence of cataract and cataract blindness in China: a systematic review and meta-analysis [J/OL]. *J Glob Health*, 2018, 8(1): 010804 [2024-07-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29977532>. DOI: 10.7189/jogh.08.010804.
- [2] Raulinajys-Grzybek M, Grabska-Liberek I, Opala A, et al. Budget impact analysis of lens material on the posterior capsule opacification (PCO) as a complication after the cataract surgery [J/OL]. *Cost Eff Resour Alloc*, 2020, 18: 19 [2024-07-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32549794>. DOI: 10.1186/s12962-020-00214-y.
- [3] Wormstone IM, Wormstone YM, Smith A, et al. Posterior capsule opacification: what's in the bag? [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 82: 100905 [2024-07-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32977000>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100905.
- [4] Rogers S, Scholpp S. Vertebrate Wnt5a-at the crossroads of cellular signalling [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 125: 3-10. DOI: 10.1016/j.semedb.2021.10.002.
- [5] 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.
- [6] 刘婷婷, 包秀丽. 后囊膜混浊相关分子调控通路研究进展 [J]. *眼科新进展*, 2018, 38(6): 592-596. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2018.0140.
Liu TT, Bao XL. Molecular regulatory pathways associated with posterior capsular opacification [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2018, 38(6): 592-596. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2018.0140.
- [7] Kumar A, Singh UK, Kini SG, et al. JNK pathway signaling: a novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(15): 2065-2086. DOI: 10.4155/fmc.15.132.
- [8] Ghafouri-Fard S, Abak A, Mohaqiq M, et al. Interaction between non-coding RNAs and JNK in human disorders [J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111497 [2024-07-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33735819>. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111497.
- [9] Wei W, Li H, Li N, et al. WNT5A/JNK signaling regulates pancreatic cancer cells migration by phosphorylating paxillin [J]. *Pancreatology*, 2013, 13(4): 384-392. DOI: 10.1016/j.pan.2013.05.008.
- [10] Beljaars L, Daliri S, Dijkhuizen C, et al. WNT-5A regulates TGF- β -related activities in liver fibrosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(3): G219-G227. DOI: 10.1152/ajpgi.00160.2016.
- [11] Kumawat K, Menzen MH, Bos IS, et al. Noncanonical WNT-5A signaling regulates TGF- β -induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells [J]. *FASEB J*, 2013, 27(4): 1631-1643. DOI: 10.1096/fj.12-217539.
- [12] Dzialo E, Tkacz K, Blyszczuk P. Crosstalk between the TGF- β and WNT signalling pathways during cardiac fibrogenesis [J]. *Acta Biochim Pol*, 2018, 65(3): 341-349. DOI: 10.18388/abp.2018_2635.
- [13] Chen YS, Mathias RA, Mathivanan S, et al. Proteomics profiling of Madin-Darby canine kidney plasma membranes reveals Wnt-5a involvement during oncogenic H-Ras/TGF-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition [J/OL]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(2): M110.001131 [2024-07-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20511395>. DOI: 10.1074/mcp.M110.001131.
- [14] Lyu J, Joo CK. Wnt-7a up-regulates matrix metalloproteinase-12 expression and promotes cell proliferation in corneal epithelial cells during wound healing [J/OL]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22): 21653-21660 [2024-07-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802269>. DOI: 10.1074/jbc.M500374200.
- [15] Saika S, Okada Y, Miyamoto T, et al. Role of p38 MAP kinase in regulation of cell migration and proliferation in healing corneal epithelium [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(1): 100-109. DOI: 10.1167/iovs.03-0700.
- [16] Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, et al. EMT, cell plasticity and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(4): 645-654. DOI: 10.1007/s10555-016-9648-7.
- [17] 尹青, 裴颖, 左玲. 转化生长因子在后发性白内障形成机制中的研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(2): 328-331.
- [18] Huang WR, Zhang Y, Tang X. Shikonin inhibits the proliferation of human lens epithelial cells by inducing apoptosis through ROS and caspase-dependent pathway [J]. *Molecules*, 2014, 19(6): 7785-7797. DOI: 10.3390/molecules19067785.
- [19] Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, et al. The good and the bad collagens of fibrosis-their role in signaling and organ function [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 43-56. DOI: 10.1016/j.addr.2017.07.014.
- [20] 包秀丽, 刘婷婷, 王艳艳, 等. Wnt3a 诱导人晶状体上皮细胞细胞外基质合成和胶原凝胶收缩的机制研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(7): 597-601. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.07.005.
Bao XL, Liu TT, Wang YY, et al. Wnt3a-induced extracellular matrix production and gel contraction in human lens epithelial cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(7): 597-601. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.07.005.
- [21] 陈奕嘉, 李金燕, 欧阳帅, 等. Wnt5a 作用下人胚胎干细胞定向分化为晶状体小体的差异表达基因分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(10): 837-844. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200308-00156.
Chen YJ, Li JY, Ouyang S, et al. Differentially expressed genes analysis on the role of Wnt5a in lentoid body induction from human embryonic stem cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38(10): 837-844. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200308-00156.
- [22] Kumawat K, Menzen MH, Bos IS, et al. Noncanonical WNT-5A signaling regulates TGF- β -induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells [J]. *FASEB J*, 2013, 27(4): 1631-1643. DOI: 10.1096/fj.12-217539.

(收稿日期: 2024-09-25 修回日期: 2025-02-10)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

