

bFGF 诱导人晶状体上皮细胞增殖过程中细胞外信号调节激酶的作用

孔 珺¹, 孔 玮², 汪亚伦³, 张雪岩¹, 张劲松¹

基金项目: 中国辽宁省教育厅科技攻关资助项目 (No. 05L564)
作者单位: ¹ (110005) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院眼科 辽宁省高校晶状体重点实验室; ² (110005) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院眼科 沈阳市第四人民医院眼科; ³ (110034) 中国辽宁省沈阳市, 沈阳医学院生化教研室
作者简介: 孔珺, 女, 眼科学博士, 导师张劲松教授, 主要从事白内障与后发性白内障、屈光手术的基础与临床研究。
通讯作者: 孔玮, 女, 主任医师, 毕业于中国医科大学, 现于美国 Bascom Palmer 研究所研修, 研究方向: 青光眼. kongjun1975@sina.com; 张劲松, 男, 教授, 博士研究生导师, 中国医科大学附属眼科医院院长, 从事眼科临床、科研及教学工作 30a, 研究方向: 白内障人工晶状体技术. zhangjscmu@126.com
收稿日期: 2009-08-03 **修回日期:** 2009-08-20

Activation of extracellular regulated kinase in the proliferation process of human lens epithelial cells induced by bFGF

Jun Kong¹, Wei Kong², Ya-Lun Wang³, Xue-Yan Zhang¹, Jin-Song Zhang¹

Foundation item: Key Problems Foundation in Science and Technology of the Department of Education of Liaoning Province, China (No. 05L564)

¹ Department of Ophthalmology, the 4th Affiliated Hospital of China Medical University; Lens Key Lab of Institution of Higher Learning of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China;

² Department of Ophthalmology, the 4th People's Hospital, Shenyang 110005, Liaoning Province, China; ³ Department of Biochemistry, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China

Correspondence to: Wei Kong. Department of Ophthalmology, the 4th People's Hospital, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. kongjun1975@sina.com; Jin-Song Zhang. Department of Ophthalmology, the 4th Affiliated Hospital of China Medical University; Lens Key Lab of Institution of Higher Learning of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. zhangjscmu@126.com

Received: 2009-08-03 Accepted: 2009-08-20

Abstract

• **AIM:** To investigate MAPKs-ERK signal transduction in the proliferation process of human lens epithelial cell (HLEC) induced by basic fibroblast growth factor (bFGF) and to detect the inhibition effect of ERK's blocker PD98059 on the proliferation of HLEC.

• **METHODS:** HLEC line SRA01/04 was cultured *in vitro*. MTT and [³H]-thymidine incorporation were used to observe the inhibition effect of PD98059 on the cultured cells and the synthesis of DNA. Western-blot was employed to detect the expression ERK1/2, JNK, P38 and COX-2 protein in HLEC.

• **RESULTS:** PD98059 treatment at different concentrations

(1, 5, 10 μmol/L) resulted in significantly inhibition on cell proliferation and DNA synthesis of HLEC induced by bFGF in a dose-dependent manner. The results of Western-blot showed that expression of phospho-ERK1/2 protein increased in HLEC after treated with 10 μg/L bFGF in a time-dependent manner, and negative effect occurred after co-treated with 10 μmol/L PD98059. bFGF at 10 μg/L concentration had no impact on the expression level of nonphospho-ERK1/2, JNK and P38 protein.

• **CONCLUSION:** The phosphor-ERK is an important regulator of the signal transduction in the proliferation process of HLEC induced by bFGF.

• **KEYWORDS:** human lens epithelial cell; extracellular regulated kinase; cyclooxygenase-2; PD98059; inhibition

Kong J, Kong W, Wang YL, *et al*. Activation of extracellular regulated kinase in the proliferation process of human lens epithelial cells induced by bFGF. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(9):1665-1667

摘要

目的: 检测细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated kinase, ERK) 在碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 诱导的人晶状体上皮细胞增殖过程中的表达与活化; 检测 ERK1/2 特异性阻断剂 PD98059 对人晶状体上皮细胞增殖的影响。

方法: 人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 体外培养, 采用 MTT 比色法和 [³H]-TdR 掺入法检测 ERK 阻断剂 PD98059 对人晶状体上皮细胞活力和 DNA 合成的影响; Western blot 法测定 bFGF 对培养的人晶状体上皮细胞 ERK, c-Jun 氨基末端激酶 (JNK), P38 蛋白表达及 PD98059 对环氧合酶-2 (COX-2) 表达的影响。

结果: 10 μg/L bFGF 能显著刺激人晶状体上皮细胞增生, 1 μmol/L PD98059 即能显著抑制 bFGF 启动的 HLEC 增殖, 其效应呈浓度依赖性 ($P < 0.01$)。10 μg/L bFGF 可激活 ERK 信号通路, 诱导 COX-2 蛋白表达, 其效应在 30 min 内达到高峰, 6h 后逐渐减弱, 此作用可被 10 μmol/L PD98059 阻断; 10 μg/L bFGF 对非磷酸化 ERK, 磷酸化和非磷酸化 JNK 及 P38 表达无明显影响。

结论: 有丝分裂原活性蛋白激酶信号传导通路中 ERK 磷酸化对 bFGF 启动的人晶状体上皮细胞增殖具有重要的调节作用。

关键词: 晶状体上皮细胞; ERK; COX-2; PD98059; 抑制
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2009. 09. 008

孔珺, 孔玮, 汪亚伦, 等. bFGF 诱导人晶状体上皮细胞增殖过程中细胞外信号调节激酶的作用. *国际眼科杂志* 2009;9(9):1665-1667

0 引言

细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated kinase,

ERK)是有丝裂原活性蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)家族5个亚类之一^[1,2]。ERK可被生长因子、激素、神经递质、细胞应激反应等激活,在细胞生长、发育、分裂、死亡及恶性转化过程中发挥重要作用^[3]。ERK在多种眼组织中有分布,参与了眼的生理和病理过程。我们以往的研究表明碱性成纤维细胞因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)可通过激活细胞内多种信号传导途径启动晶状体上皮细胞的增殖、移行及纤维化^[4,5]。我们研究细胞外信号调节激酶在bFGF诱导的人晶状体上皮细胞增殖过程中的表达与活化;检测ERK1/2特异性阻断剂PD98059对人晶状体上皮细胞增殖的影响,其结果有助于进一步阐释后发性白内障形成的相关信号传导机制。

1 材料和方法

1.1 材料 标准人晶状体上皮细胞(HLEC)系SRA01/04细胞。NAPCO 5410型CO₂培养箱(美国);苏州净化设备厂超净工作台;倒置相差显微镜OLYMPUS IMT-2;Bio-RAD PAC 3000型电泳仪;Hermle-Z383K型低温高速离心机;Kodak1D型凝胶自动成像分析系统;美国BeckMan LS 3801型液闪仪;奥地利泰肯公司Sunrise Remote酶标仪。DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶及Trizol试剂盒均为Gibco公司生产;bFGF(Sigma);SP免疫组化试剂盒、兔抗人环氧合酶-2(COX-2)多克隆抗体和生物素标记的羊抗兔IgG抗体(北京中山生物技术有限公司);[³H]TdR(北京原子能公司);MAPKs试剂盒及碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG抗体(Santa Cruz公司);PD98059(Promega);其它试剂均为分析纯试剂。PD98059药液的配制:用二甲亚砜(DMSO)溶解,配成20mmol/L和10mmol/L储存液,用DMEM稀释至1.5、10 μ mol/L,-20℃保存备用。

1.2 方法 参照曲勃等^[3]方法进行解冻和传代培养人晶状体上皮细胞系SRA01/04。取对数生长期的SRA01/04细胞,用2.5g/L胰酶消化后,制成单细胞悬液。用含150ml/L胎牛血清DMEM培养液调整细胞密度至2 \times 10⁸/L,分别接种于96孔培养板和24孔培养板中,继续培养24h后,换无血清培养液培养12h,使细胞进入生长停止期。用含10 μ g/L bFGF处理细胞24h,处理前1h分别加入不同浓度的PD98059干预细胞,依次进行细胞活力检测和DNA合成检测。实验分为空白组(无血清培养液)、对照组(bFGF组)、bFGF+PD1组、bFGF+PD2组、bFGF+PD3组,bFGF的浓度为10 μ g/L,PD1,PD2,PD3组的浓度依次为1.5、10 μ mol/L PD98059。

1.2.1 细胞活力的检测 将SRA01/04细胞按每孔200 μ L接种于96孔培养板中,每一浓度设6个复孔,继续培养24h。然后每孔加入5g/L MTT溶液20 μ L继续孵育4h后终止培养。吸弃孔中的培养液,加入二甲亚砜溶液150 μ L,室温下微量振荡器振荡10min,用酶联免疫检测仪于492nm处测定吸光度A值。按公式 $[1-(c-a) \div (b-a)] \times 100\%$ 计算细胞抑制率,以只加培养液不加细胞的空白对照孔调零。

1.2.2 DNA合成的检测 将SRA01/04细胞按每孔1mL接种于24孔培养板中,每一浓度设3个复孔,继续培养24h。处理结束前3h每孔加入1.4kBq [³H]TdR。处理结束后冷PBS洗2次,加2mL的100g/L三氯乙酸(TCA),放置10min,若细胞松散,加甲醇固定10min;100g/L TCA洗2次 \times 5min,沉淀DNA;每孔加入0.3mmol/L NaOH 0.5mL,在60℃条件下处理细胞30min,冷却至室温,收集细胞至乙酸纤维素膜上,烤干,将乙酸纤维素膜置于闪烁计数管中,每管加闪烁液10mL,闪烁仪测定每分钟脉冲数(cpm值);结果以cpm/5000细胞表示。

1.2.3 ERK1/2, P38, JNK 蛋白表达的检测 含10 μ g/L bFGF无血清培养液孵育细胞,对照组使用不含bFGF的无血清培养液,孵育时间分别为5,15,30,60,180,360min。终止培养后,用冰冷的0.02mol/L PBS冲洗细胞3次,置于冰盒上,用细胞刮取器刮下细胞,离心,加入裂解液(2mmol/L EDTA,10mmol/L ECTA,20mmol/L Tris-HCL pH7.5,2mmol/L PMSF,0.25mol/L蔗糖)300 μ L,超声粉碎,4℃离心,17500r/min离心2h;将蛋白样品用120g/L SDS-PAGE分离而后电转移至硝酸纤维素膜上,含50g/L牛血清白蛋白的TTBS封闭1h,加上特异性一抗(1:400)4℃过夜,TBS洗10min \times 4次,加入碱性磷酸酶(1:2000)室温孵育2h,加入显色剂;硝酸纤维素膜经Kodak1D型凝胶自动成像扫描仪分析,记录光密度。实验重复3次。

1.2.4 PD98059及阿司匹林对bFGF刺激下人晶状体上皮细胞COX-2蛋白和磷酸化ERK1/2蛋白表达的影响 取对数生长期的SRA01/04细胞,用2.5g/L胰酶消化后制成单细胞悬液。用含150g/L FCS的DMEM培养液调整细胞密度至2 \times 10⁸/L,培养24h后换无血清培养液,加入10 μ mol/L PD98059或10mmol/L阿司匹林预处理细胞1h后,加入10 μ g/L bFGF继续孵育细胞6h,检测COX-2和磷酸化-ERK1/2蛋白的表达。实验分为对照组(无血清组)、bFGF组、bFGF+PD组、bFGF+阿司匹林组,具体实验步骤同上。

统计学分析:SPSS 10.0统计软件包进行数据处理,均数比较采用Student *t*检验。

2 结果

2.1 人晶状体上皮细胞的增殖 10 μ g/L bFGF对人晶状体上皮细胞增殖具有明显促进作用(A:1.1 \pm 0.13 vs 0.75 \pm 0.05, $P < 0.01$)。1 μ mol/L PD98059即可抑制bFGF启动的人晶状体上皮细胞增殖,具有显著统计学意义(vs A 0.74 \pm 0.04, $P < 0.01$),且抑制效应呈浓度依赖性(vs A 0.64 \pm 0.05, 0.44 \pm 0.03, $P < 0.01$)。

2.2 人晶状体上皮细胞DNA的合成 10 μ g/L bFGF与0, 1.5, 10 μ mol/L PD98059共同孵育24h后,[³H]-TdR掺入的结果分别为1815,923,667,557cpm/5000个细胞,人晶状体上皮细胞的DNA合成明显受到抑制,1 μ mol/L PD98059对bFGF启动的人晶状体上皮细胞DNA合成抑制率达48.6%,且抑制效应呈浓度依赖性。

2.3 ERK1/2, P38, JNK 表达蛋白 Western blot检测结果显示,人晶状体上皮细胞(HLEC)体外培养过程中磷酸化和非磷酸化ERK有一定水平的基础表达。当给予10 μ g/L bFGF刺激时,磷酸化ERK蛋白电泳条带随bFGF作用时间的延长而逐渐颜色加深,30min达到最高峰,持续6h后减弱(图1A),而非磷酸化ERK表达无明显变化(图1B)。人晶状体上皮细胞体外培养过程中磷酸化P38蛋白及非磷酸化P38均有一定表达。当给予10 μ g/L bFGF刺激后,磷酸化和非磷酸化P38蛋白表达没有显著变化(图1C, D)。人晶状体上皮细胞体外培养过程中c-Jun氨基末端激酶(JNK)有一定水平的基础表达。当给予10 μ g/L bFGF刺激后,其表达水平在0~6h各时间段均未见上调。

2.4 COX-2蛋白和磷酸化ERK1/2蛋白的表达 Western blot检测结果显示10 μ g/L bFGF作用后人晶状体上皮细胞出现COX-2蛋白表达的条带,10 μ mol/L PD98059与10 μ g/L bFGF共同作用下COX-2蛋白表达水平降低(图2A),磷酸化ERK1/2蛋白表达呈阴性(图2B)。10mmol/L阿司匹林与10 μ g/L bFGF共同作用下COX-2蛋白表达呈阴性(图2A),磷酸化ERK1/2蛋白表达略降低(图2B)。

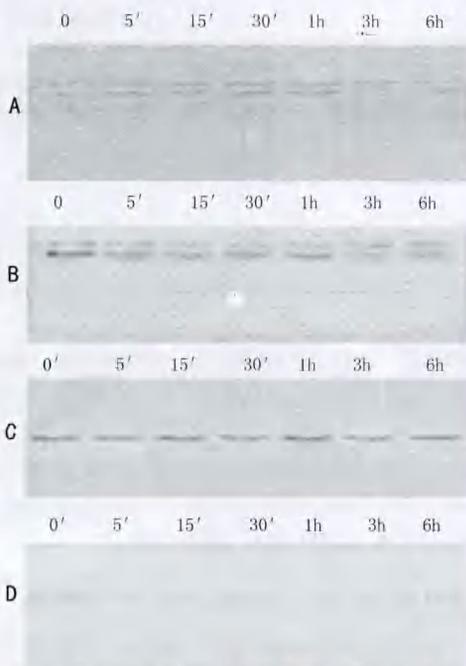


图1 bFGF对ERK1/2和P38蛋白表达的影响 A:磷酸化ERK1/2;B:非磷酸化ERK1/2;C:磷酸化P38;D:非磷酸化P38

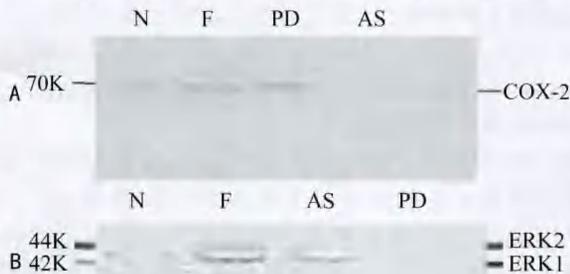


图2: PD98059及阿司匹林对HLEC COX-2和磷酸化ERK1/2蛋白表达的影响 N:空白组, F: bFGF组, PD: bFGF + PD98059组, AS: bFGF + 阿司匹林组 A: COX-2; B: ERK1/2

3 讨论

晶状体囊膜赤道部残留的晶状体上皮细胞增殖、迁移、分化是后发性白内障形成的主要原因^[6]。大量研究证明, bFGF与后发性白内障的形成密切相关^[7,8]。白内障囊外摘除术中前囊膜及血房水屏障的破坏可导致眼前房bFGF的浓度大幅度升高。此外, 生理状态下被前囊膜覆盖的晶状体上皮细胞一旦暴露于房水中, 房水中正常存在的bFGF浓度就足以促进晶状体上皮细胞增殖、移行、分化。目前bFGF启动的晶状体上皮细胞内信号传导机制尚不十分清楚。MAPK与细胞生长最密切也是近年研究最多的通路^[9]。其中ERK1/2是MAPK家族的主要成员之一, 参与调节细胞骨架、细胞生长及分化等, 是信号传导通路的中枢部分^[10]。ERK1/2以非磷酸化形式存在于胞质中, 磷酸化后被激活, 进而激活下游信号分子构成复杂的信号传导网络, 产生生物学效应。ERK通路通过以下4条途径激活: (1)受体酪氨酸激酶Ras的激活^[10]; (2)Ca²⁺对Ras的激活^[11]; (3)蛋白激酶C对ERK通路的活化^[12]; (4)G蛋白偶联受体对ERK通路的激活^[13]。我们以往的研究证实bFGF可诱导家兔晶状体上皮细胞酪氨酸蛋白激酶及蛋白激酶C磷酸化^[14]; bFGF通过激活酪氨酸激酶信号系统途径引起人晶状体上皮细胞内Ca²⁺浓度升高^[5]。而

酪氨酸蛋白激酶、蛋白激酶C, Ca²⁺均为ERK通路的上游启动因子。我们证实, bFGF作用后人晶状体上皮细胞磷酸化ERK1/2水平明显升高, 此效应在作用30min时达到峰值, 6h后逐渐减弱; COX-2是这一通路的下游信号分子之一, 而作为有丝裂原活性蛋白激酶家族的另一重要成员P38及有丝裂原活性蛋白激酶的靶蛋白之一JNK未参与此过程。本结果还表明, 不同浓度的ERK特异性阻断剂PD98059可显著抑制bFGF启动的人晶状体上皮细胞增殖及COX-2蛋白表达。PD98059本身不直接影响COX-2的活性, COX-2表达量的降低可能是阻断ERK的结果。特异性地抑制ERK的磷酸化可阻止细胞外刺激信号转导至人晶状体上皮细胞及其核内, 从而影响细胞的增殖、分化、转化或凋亡等一系列生物学效应。COX非选择性抑制剂阿司匹林可完全阻断bFGF启动的人晶状体上皮细胞COX-2蛋白表达增高, 对磷酸化ERK1/2表达也具有一定抑制作用, 提示COX-2作为ERK1/2磷酸化的下游分子对ERK1/2磷酸化具有反馈调节作用。我们也观察到, 虽然PD98059对人晶状体上皮细胞的抑制作用随浓度的升高而增强, 表现出浓度依赖性, 但PD98059不能完全抑制人晶状体上皮细胞的增殖。这可能是bFGF激活的人晶状体上皮细胞增殖过程涉及了多途径的复杂信号传导途径, ERK只是下游效应分子之一。

从信号传导通路入手探讨后发性白内障的发生机制受到越来越多的关注。深入研究后发性白内障发生的信号传导系统不仅能进一步阐明后发性白内障的发病机制, 还可为开辟后发性白内障治疗的新途径提供理论和实验依据。关于多种生长因子、细胞因子及炎症介质启动的白内障术后晶状体上皮细胞异常增殖、移行、纤维化过程中所涉及的庞大而复杂的信号传导系统有待于我们进一步深入探索。

参考文献

- 1 Ohori M. ERK inhibitors as a potential new therapy for rheumatoid arthritis. *Drug News Perspect* 2008; 21(5):245-250
- 2 Werry TD, Christopoulos A, Sexton PM. Mechanisms of ERK1/2 regulation by seven-transmembrane-domain receptors. *Curr Pharm De* 2006; 12(14):1683-1702
- 3 Wang X, Tournier C. Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal* 2006; 18(6):753-760
- 4 孔玮, 张劲松, 张雪岩, 等. 环氧化酶-2在bFGF诱导的人晶状体上皮细胞增殖中的表达. *中国实用眼科杂志* 2004; 22(12):964-967
- 5 曲勃, 张劲松. 碱性成纤维细胞生长因子作用于人晶状体上皮细胞系内Ca²⁺转导通路的初步研究. *中华眼科杂志* 2004; 40(12):832-835
- 6 Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, et al. Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol* 1992; 37(2):73-116
- 7 Nishi O, Nishi K, Fujiwara T, et al. Effects of the cytokines on the proliferation of and collagen synthesis by human cataract lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 1996; 80(1):63-68
- 8 Iharaki N, Liu LR, Reddy VN. Effects of growth factors on proliferation and differentiation in human lens epithelial cells in early subculture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(11):2304-2312
- 9 Donovan JC, Milic A, Slingerland JM. Constitutive MEK/MAPK activation leads to p27 (Kip1) deregulation and antiestrogen resistance in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2001; 276(44):40888-40895
- 10 Watts SW. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway via the 5-HT2A receptor. *Ann N Acad Sci* 1998; 15(861):162-168
- 11 Callen PJ, Lockyer PJ. Intergration of calcium and Ras signaling. *Nat Rev Cell Biol* 2002; 3(5):339-348
- 12 Crespo P, Xu NZ, Simonds WF, et al. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 1994; 369(6479):418-420
- 13 Lopez-Illasaca M. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein MAP kinase cascades. *Biochem Pharmacol* 1998; 56(3):269-277
- 14 孔玮, 张劲松. bFGF诱导的兔晶状体上皮细胞TPK及PKC磷酸化的研究. *中国实用眼科杂志* 2002; 20(12):9-15