

# FGFR1 特异性拮抗剂 SU5402 抑制人源晶状体上皮细胞增生的研究

徐 庆 贾仁兵

## Inhibitory effect of specific antagonist SU5402 of FGFR1 on growth of human LEC-B3 cells

Xu Qing, Jia Renbing. Department of Ophthalmology, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

**Abstract Objective** Posterior capsule opacification (PCO) is a common complication after cataract surgery and its underlying mechanism remains below understanding. Basic fibroblast growth factor (bFGF) is thought to play a role in the development of PCO. This study was designed to explore the effect of SU5402, a specific antagonist of bFGF receptor 1 (FGFR1), on cultured human lens epithelial cells (LECs). **Methods** LEC-B3 cells derived from human LECs were cultured in DMEM with 10% fetal bovine serum. Microscope-based evaluation and immunohistochemistry of  $\alpha$ B-crystal protein were used to identify LEC-B3 cells derivation. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect the mRNA expression of bFGF and FGFR1 in cultured cells. SU5402 at the concentration of 20  $\mu$ g/mL was added into cultured LEC-B3 cells at confluence of 70% and phosphate buffer solution (PBS) was used as negative control. Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) expression was examined by flow cytometry (FCM) 2 days later after administration of SU5402. **Results** Cultured LEC-B3 cells were found to grow as epithelial-like cells with the polygonal shape. Specific  $\alpha$ B-crystal protein was strongly expressed in cytoplasm of LEC-B3 cells. The mRNA level of bFGF and FGFR1 in LEC-B3 cells was comparable to that of control (GAPDH). The percentage of PCNA expression in LEC-B3 cells in SU5402 treated group was significantly lower than that in PBS treated group (23.95%  $\pm$  7.82% versus 58.86%  $\pm$  15.43%) ( $t = 6.374, P < 0.01$ ). **Conclusion** SU5402 inhibits the growth of LEC-B3 cells ex vivo, which promise to be an effective way to deal with posterior capsule opacification (PCO).

**Key words** posterior capsule opacification; basic fibroblast growth factor; fibroblast growth factor receptor; LEC-B3 cells; specific antagonist of fibroblast growth factor receptor 1; SU5402

**摘要 目的** 本研究探讨体外应用碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)受体1(FGFR1)特异性拮抗剂SU5402抑制人源晶状体上皮细胞(LECs)增生的影响。**方法** 光镜下观察传代培养的永生化人源LEC-B3细胞的形态,用 $\alpha$ B-晶状体蛋白免疫组织化学法鉴定其性质。采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测LEC-B3细胞中bFGF和FGFR1的mRNA表达。在传代培养、融合度为70%的LEC-B3细胞中加入SU5402(20  $\mu$ g/mL),以磷酸盐缓冲液(PBS)作为对照,2 d后用流式细胞术(FCM)检测LEC-B3细胞中细胞增生核抗原(PCNA)的表达。**结果** 传代培养的LEC-B3细胞呈多边形上皮样生长,表达特异性的 $\alpha$ B-晶状体蛋白;LEC-B3细胞中bFGF和FGFR1的mRNA表达量与内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)相当;LEC-B3细胞中PCNA阳性细胞的比例,SU5402实验组为(23.95  $\pm$  7.82)%,PBS对照组为(58.86  $\pm$  15.43)%,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** LEC-B3细胞丰富表达bFGF和FGFR1的mRNA;体外应用SU5402可显著抑制LEC-B3增生,有望成为防治后囊膜混浊(PCO)的有效方法。

**关键词** 后囊膜混浊;碱性成纤维细胞生长因子;成纤维细胞生长因子受体;晶状体上皮细胞-B3;成纤维细胞生长因子受体拮抗剂;SU5402

分类号 R 776.1 文献标识码 A 文章编号 1003-0808(2009)10-0870-04

本课题为上海市卫生局基金资助(034084)

作者单位:200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科(徐庆,现在上海建工医院眼科200083)

通讯作者:徐庆(E-mail:xuqingnan@126.com)

后囊膜混浊 (posterior capsule opacification, PCO) 是影响白内障手术复明效果的主要并发症<sup>[1]</sup>, 其发生机制尚未完全清楚。一般认为, 白内障术后残留的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 在后囊膜下迁移、增生和间充质化是 PCO 形成的细胞学基础。研究发现, 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 可能通过促进 LECs 增生和间充质化, 参与 PCO 的形成<sup>[2]</sup>。具体的过程可能是 bFGF 首先与跨细胞膜络氨酸激酶样受体结合, 引起促有丝分裂蛋白激酶和细胞外信号调节激酶等激酶磷酸化, 进而激活下游一系列信号分子, 发挥其生物学功能。现已分离出 2 种 bFGF 受体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR), 即 FGFR 和 FGFR1, 其中 FGFR1 是主要受体。SU5402 是 FGFR1 特异性拮抗剂, 可阻断 bFGF 与 FGFR1 结合, 而切断其信号传递<sup>[3]</sup>。本研究利用人源 LEC-B3 细胞, 在确定该细胞大量表达 bFGF 和 FGFR1 的 mRNA 的基础上, 探讨体外应用 SU5402 特异性拮抗 FGFR1 对 LECs 增生的影响, 以期防治 PCO 提供新的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

LEC-B3 细胞 (中山大学中山眼科中心张振平教授惠赠);  $\alpha$  B-晶状体蛋白抗体 (美国 Chemicon 公司); Trizol (美国 Invitrogen 公司); 鼠抗人细胞增生核抗原 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 抗体 (美国 BD 公司); 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 (日本 Takara 公司); 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 光镜观察和  $\alpha$  B-晶状体蛋白免疫组织化学鉴定 LEC-B3 细胞的来源** LEC-B3 细胞属人源 LECs 系, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 进行常规传代培养。免疫组织化学法检测 LEC-B3 细胞  $\alpha$  B-晶状体蛋白的表达, 主要步骤: PBS 漂洗盖玻片上培养的 LEC-B3 细胞, 室温晾干, 丙醛浸泡 20 min, PBS 漂洗, 37 °C 下用 3%  $H_2O_2$  孵育 10 min, PBS 漂洗, 羊血清 37 °C 封闭 10 min, 加抗人  $\alpha$  B-晶状体蛋白抗体, 37 °C 孵育 1 h (以 PBS 代替一抗作为阴性对照), 加生物素标记二抗, 37 °C 孵育 30 min, PBS 漂洗, 加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素, 37 °C 孵育 30 min, PBS 漂洗, DAB/ $H_2O_2$  反应染色, 自来水充分冲洗, 苏木素复染, 常规脱水、透明、干燥、封片、光学显微镜下观察。

**1.2.2 RT-PCR 法检测 LEC-B3 细胞中 bFGF 和**

FGFR1 mRNA 的表达 收集  $2 \times 10^6$  传代培养的 LEC-B3 细胞, 用 Trizol 抽提细胞总 RNA, 进行两步法 RT-PCR 反应。RT 反应体系:  $MgCl_2$  2  $\mu$ L、10 $\times$  逆转录缓冲液 1  $\mu$ L、无 RNA 酶的双蒸水抑制剂 3.75  $\mu$ L、dNTP 混合物 1  $\mu$ L、RNA 酶抑制剂 0.25  $\mu$ L、逆转录酶 0.5  $\mu$ L、随机引物 0.5  $\mu$ L、总 RNA 1  $\mu$ L。反应条件: 30 °C 10 min、50 °C 20 min、99 °C 5 min、5 °C 5 min。PCR 反应体系: 5 $\times$  PCR 缓冲液 10  $\mu$ L、双蒸水 28.75  $\mu$ L、Taq 酶 0.25  $\mu$ L、上游引物 0.5  $\mu$ L、下游引物 0.5  $\mu$ L、上述 RT 反应产物 10  $\mu$ L。bFGF 上游引物: 5' AAGAGCGACCCTCACATCA' 3, 下游引物: 5' TCGTTTCAGTGCCACATACC' 3, 产物长度 225 bp; FGFR1 上游引物: 5' GACTGGTCTTAGGCAAAC' 3, 下游引物: 5' GCGTCCGACTTCAACA' 3, 产物长度 130 bp。反应条件: 94 °C 2 min 1 个循环, 94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 2 min, 共 35 个循环。反应结束后, 取 5  $\mu$ L PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳。

**1.2.3 流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测应用 SU5402 后 LEC-B3 细胞中 PCNA 的表达** 在传代培养、融合度为 70% 的 LEC-B3 细胞中加入 SU5402 (20  $\mu$ g/mL), 以 PBS 作为阴性对照, 2 d 后用 FCM 检测 2 组 LEC-B3 细胞中表达 PCNA 的细胞比例。FCM 步骤: 离心收集 LEC-B3 细胞 (1 000 r/min  $\times$  5 min), 无水乙醇固定细胞 10 min; PBS 洗涤 2 遍, 0.1% Triton X-100 裂解冰浴细胞 5 min; PBS 重悬细胞, 室温放置 30 min 并离心收集细胞; 1 mL PBS 稀释 20 U FITC 标记的鼠抗人 PCNA 抗体, 重悬约  $10^6$  个细胞, 室温孵育 1 h; PBS 重悬洗涤细胞 3 遍; 流式细胞仪检测分析表达 PCNA 细胞百分比。

### 1.3 统计学方法

采用 SAS 6.12 统计学软件对数据资料进行统计学处理。PCNA 阳性细胞的百分比以  $\bar{x} \pm s$  表示, PCNA 阳性细胞的百分比实验组与对照组比较采用独立样本的 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 光镜观察及 LEC-B3 细胞中 $\alpha$ B-晶状体蛋白免疫组织化学结果

光镜下见传代培养的 LEC-B3 细胞呈多边形上皮样细胞生长。免疫组织化学显示, LEC-B3 细胞浆中大量表达特异性  $\alpha$  B-晶状体蛋白, 证实 LEC-B3 细胞来源于人 LECs (图 1)。

### 2.2 LEC-B3 细胞高表达 bFGF 和 FGFR1 mRNA

RT-PCR 检测表明, bFGF、FGFR1 的 mRNA 均在 LEC-B3 细胞中有表达 (图 2), FGFR1 mRNA 的表达量

较高,用 Gene snap 软件对 RT-PCR 产物电泳条带进一步分析时显示,bFGF 和 FGFR1 的 mRNA 的表达量与内参 GAPDH 相当。

### 2.3 SU5402 特异性拮抗 FGFR1 显著抑制 LEC-B3 细胞增生

SU5402 加入 LEC-B3 细胞 2 d 后,收集  $1 \times 10^6$  LEC-B3 细胞,用 FCM 检测 PCNA 的表达,显示实验组 PCNA 阳性细胞的百分比为(23.95% ± 6.82%),对照组为(58.86% ± 15.43%),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )(图 3),说明 SU5402 可在体外明显抑制 LEC-B3 细胞的增生。

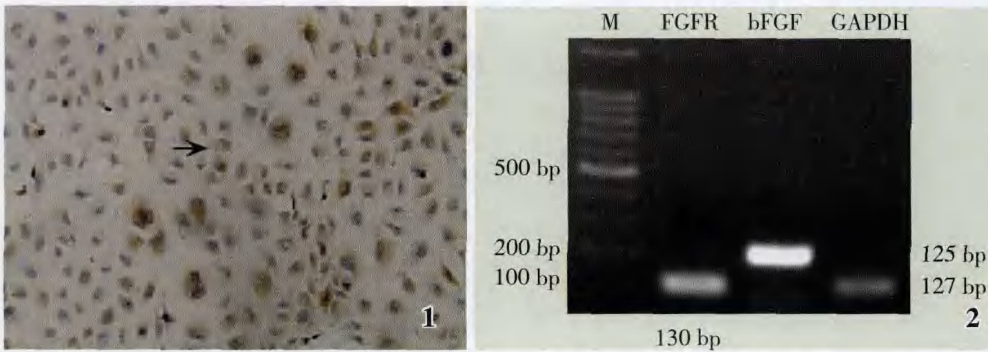


图 1 免疫组织化学鉴定培养的细胞 LEC-B3 细胞呈多边形上皮样细胞生长,α B-晶状体蛋白表达阳性,位于细胞浆中(→),证实所用细胞确系人源 LECs(×100) 图 2 bFGF mRNA、FGFR1 mRNA 和 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图 RT-PCR 检测显示 LEC-B3 细胞中丰富表达 bFGF 和 FGFR1 的 mRNA,表达量与内参 GAPDH 相当 M:分子标记、bFGF mRNA、FGFR1 mRNA 和 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物条带分别为 130、225、127 bp

Fig. 1 Identification of cultured cells LEC-B3 cells grow like polygonal epithelial cells and show positive response for αB-crystalline, presenting brown staining in cytoplasm. This is confirmed that used cells are LECs from human being Fig. 2 Electropherogram of RT-PCR products of bFGF mRNA, FGFR1 mRNA and GAPDH mRNA bFGF mRNA and FGFR1 mRNA are abundantly expressed. They are comparable to that of GAPDH in LEC-B3 cells. The RT-PCR products size of bFGF mRNA, FGFR1 mRNA and GAPDH mRNA is 130 bp, 225 bp and 127 bp, respectively M; marker

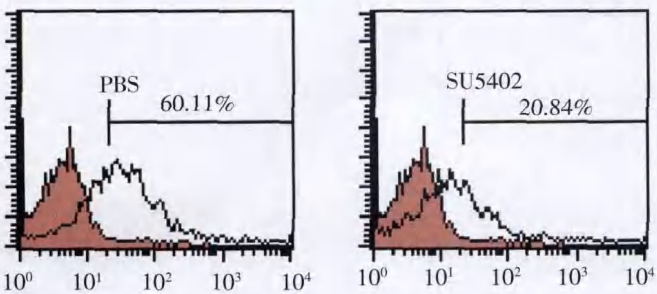


图 3 体外应用 SU5402 对 LEC-B3 细胞增生的抑制 SU5402 加入 LEC-B3 细胞 2 d 后,实验组中 PCNA 阳性细胞比例显著低于对照组,图中百分比表示表达 PCNA 细胞的比例( $t = 6.374, P < 0.01$ )

Fig. 3 The inhibitory effect of in vitro administration of SU5402 on growth of LEC-B3 cells The percentage of PCNA expression in LEC-B3 cells in SU5402 treated group is significantly lower than that in PBS treated group( $t = 6.374, P < 0.01$ )

### 3 讨论

手术残留的 LECs 在后囊下迁移、增生和间充质化是 PCO 形成的关键机制,bFGF 被认为是调控 LECs 增生和间充质化的主要因子。研究发现 bFGF 不仅可促进 LECs 的有丝分裂,还可促进 LECs 向成纤维细胞的分化<sup>[4]</sup>;而 bFGF 反义寡核苷酸可抑制 LECs 的增生和迁移<sup>[5]</sup>;后囊下 LECs 的分裂能力可被 bFGF 抗体抑制<sup>[6]</sup>。可见,bFGF 的作用通路是抑制 LECs 的增生和间充质化,防止 PCO 形成有效的靶点,但是目前的研究大多是直接针对 bFGF 的,围绕其受体的研究很少。

本研究针对 FGFR1 做了一些初步工作。

SU5402 是一种化学合成物质,尚无合适的中文名,英文名为 3-[3-(2-Carboxyethyl)-4-methylpyrrol-2-methylidene]-2-indolinone,由 Mohammadi 等<sup>[3]</sup>首先合成,是靶向 FGFR1 的拮抗剂,可高效阻断 FGFR1 功能,且对胰岛素样生长因子受体和表皮生长因子受体等作用轻微,具有很强的特异性。在肿瘤等疾病和发育学研究中,SU5402 应用较为广泛,体现出良好的生物活性<sup>[7-12]</sup>。Wormstone 等<sup>[13]</sup>应用囊袋培养的细胞生长模型,首先验证了

SU5402 可抑制白内障术后囊袋内残留 LECs 的生长,提出 SU5402 及其类似物有望在 PCO 的临床防治中发挥重要作用。本研究结果显示,在离体环境中 SU5402 能够显著抑制永生生化人源 LEC-B3 细胞的增生,为上述论断提供了新的实验依据。

bFGF 在 LECs、囊膜、房水中广泛表达,也存在于培养的人 LECs、囊膜和手术所获的囊膜中<sup>[13-15]</sup>。本研究表明,除了 bFGF、FGFR1 的 mRNA 在 LEC-B3 细胞中亦表达丰富,RT-PCR 产物电泳条带灰度分析显示,bFGF 和 FGFR1 的 mRNA 表达量与内参基因相当。据此推测 LEC-B3 细胞可能会分泌 bFGF,通过与在细胞表面大量表达的 FGFR1 结合,以正向循环的方式促进自身增生。bFGF 还可通过 FGFR1 以外的受体发挥生物学作用,因此,理论上直接阻断 bFGF 的作用对

抑制 LECs 的增生更为有效。目前常用抗体阻断 bFGF,但潜在的免疫性不良反应不容忽视。SU5402 是专门针对 FGFR1 等酪氨酸激酶样跨膜受体设计的化合物,安全性高于抗体物质,更具临床应用前景。此外,FGFR1 是 bFGF 的主要受体,接受并向细胞内下游分子传递大部分 bFGF 信号。本研究加入 SU5402 2 d 后观察到,LEC-B3 细胞增生抑制率 > 60%,说明拮抗 FGFR1 可较大程度上消除 bFGF 在 LECs 增生中的促进作用。

考虑到 LEC-B3 细胞在传代培养过程中可能会发生性状改变,失去 LECs 的特性,比如向成纤维细胞分化,尤其是在多次传代后更易发生,从而影响实验的可靠性。因此,本研究在加入 SU5402 之前,分别从形态学和组织学角度对 LEC-B3 细胞进行了鉴定。光镜下可见 LEC-B3 细胞呈多边形上皮样细胞生长,免疫组织化学结果显示,LEC-B3 细胞胞浆中大量表达特异性  $\alpha$  B 晶状体蛋白,证明实验所用的 LEC-B3 细胞仍维持 LECs 的性状。PCNA 只在增生期细胞中表达,是判断细胞增生能力的重要指标之一。以往多用免疫组织化学方法检测 PCNA 表达,该方法简单易行,但定性检测方法,主观误差较大,且不能定量确定细胞的增生能力。本研究应用 FCM 检测 LEC-B3 细胞中 PCNA 表达,可通过直接比较表达 PCNA 细胞的百分比,明确 SU5402 对 LEC-B3 细胞增生的抑制程度,结果更为直观、可靠。

本研究表明,人源 LEC-B3 细胞大量表达 bFGF 及其主要作用受体 FGFR1 的 mRNA;体外应用 FGFR1 特异性拮抗剂 SU5402 可有效抑制 LEC-B3 细胞的增生,有望在以抑制 LECs 增生和间充质化为基础的 PCO 的防治中发挥重要作用。当然,建立合适的 PCO 动物模型,模拟 PCO 形成的环境和过程,进一步确立 SU5402 对 PCO 形成的抑制作用,有助于最终将 SU5402 及其类似物应用在 PCO 防治的临床研究中。

## 参考文献

1 Ozdemir HG. A long-term follow-up study of different irrigation/

- aspiration techniques on formation of posterior capsule opacification[J]. Can J Ophthalmol,2007,42: 849 - 851
- 2 Kase S, Yoshida K, Jin XH, et al. Phosphorylation of p27(KIP1) in lens epithelial cells after extraction of fiber cells[J]. Int J Mol Med,2006, 18: 1187 - 1191
- 3 Mohammadi M, McMahon G, Sun L, et al. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors[J]. Science,1997,76: 955 - 960
- 4 Huang JX, Feldmeier M, Shui YB. Evaluation of fibroblast growth factor signaling during lens fiber cell differentiation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2003,44: 680 - 690
- 5 刘宏伟,王香兰,彭淑玲,等. 碱性成纤维细胞生长因子反义寡核苷酸及其脂质体对体外培养的大鼠晶状体上皮细胞增生的抑制作用[J]. 中华眼科杂志,2004,40: 528 - 530
- 6 Schulz MW, Chamberlain CG, de Longh RU, et al. Acidic and basic FGF in ocular media and lens: implications for lens polarity and growth patterns[J]. Development,1993,118: 117 - 126
- 7 Hatziaepostolou M, Polyarchou C, Katsoris P, et al. Heparin affine regulatory peptide/pleiotrophin mediates fibroblast growth factor 2 stimulatory effects on human prostate cancer cells[J]. J Biol Chem, 2006,281: 32217 - 32226
- 8 Ishibe T, Nakayama T, Okamoto T, et al. Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy [J]. Clin Cancer Res,2005,11: 2702 - 2712
- 9 Udayakumar TS, Bair EL, Nagle RB, et al. Pharmacological inhibition of FGF receptor signaling inhibits LNCaP prostate tumor growth, promatrilysin, and PSA expression[J]. Mol Carcinog,2003,38: 70 - 77
- 10 Fischer H, Taylor N, Allerstorfer S, et al. Fibroblast growth factor receptor-mediated signals contribute to the malignant phenotype of non-small cell lung cancer cells; therapeutic implications and synergism with epidermal growth factor receptor inhibition[J]. Mol Cancer Ther,2008, 7: 3408 - 3419
- 11 Neugebauer JM, Amack JD, Peterson AG, et al. FGF signaling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia [J]. Nature,2009,458: 651 - 654
- 12 Katoh M. Cancer genomics and genetics of FGFR2 [J]. Int J Oncol, 2008,33: 233 - 237
- 13 Wormstone IM, del Rio-Tsonis K, McMahon G, et al. FGF: an autocrine regulator of human lens cell growth independent of added stimuli[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2001,42: 1305 - 1311
- 14 Lovicu FJ, de Longh RU, McAvoy JW. Expression of FGF-1 and FGF-2 mRNA during lens morphogenesis, differentiation and growth [J]. Curr Eye Res,1997,16: 222 - 225
- 15 刘冬林,吴静安. 人原代晶状体上皮细胞 bFGF 多肽和 mRNA 的表达[J]. 中华眼科杂志,1998,34: 205 - 207

(收稿:2008-12-28 修回:2009-08-10)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

## 本刊关于网上投稿的启事

本刊已实行网上审稿、网上退修等,欢迎广大作者从网上投稿。单位介绍信和图片仍请邮寄。没有条件上网的作者投稿时请附光盘。本刊电子信箱:kykzz@yahoo.com.cn

(本刊编辑部)