

TGF- β_2 体外抑制牛角膜内皮细胞增殖的研究

陆秀兰, 张明昌

作者单位: (430022) 中国湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科

作者简介: 陆秀兰, 女, 硕士研究生, 研究方向: 角膜病。

通讯作者: 张明昌, 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 眼科主任兼眼科准分子激光中心执行主任, 全国学组委员, 武汉市眼科学会副主任委员, 省激光医学会副主任委员, 研究方向: 角膜病, 主要成果: 在国内首先开展准分子激光治疗性切削术联合屈光性切削治疗角膜混浊合并近视、眼球震颤合并近视等。mingchangzhang@hotmail.com

收稿日期: 2009-03-30 修回日期: 2009-05-19

Inhibitory effect of transforming growth factor- β_2 on bovine corneal endothelial cells *in vitro*

Xiu-Lan Lu, Ming-Chang Zhang

Department of Ophthalmology, Union Hospital of Tongji Medical College and Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Ming-Chang Zhang. Department of Ophthalmology, Union Hospital of Tongji Medical College and Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. mingchangzhang@hotmail.com

Received: 2009-03-30 Accepted: 2009-05-19

Abstract

• AIM: To observe the inhibitory effect of transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2) on the bovine corneal endothelial cells (bCECs) *in vitro* and investigate its possible molecular mechanism.

• METHODS: MTT assay: the 3rd passage bCECs were treated with different concentrations of TGF- β_2 (0.1, 1, 10, 100ng/L). The cells were cultured in three 96-wells plates for 24, 48, 72 hours respectively. There were 6 groups including a vacant control group and a negative control group in each plate. The inhibitory effect of TGF- β_2 on the bCECs growth was measured by the value of absorption of 3-(4, 5-dimethylthiazozyl)-2, 5-diphenyl tetrazodium bromide (MTT) 24, 48, 72 hours after the treatment. Flow cytometer (FCM): The cell cycle of each group were tested by FCM 48 hours after the treatment. RT-PCR: the bCECs were cultured *in vitro* and incubated for 48 hours, then collected for RNA extraction and reverse transcription. The primer was designed for bovine p27Kip1 based on its gene sequence. The expression of gene p27Kip1 was detected by RT-PCR.

• RESULTS: The 0.1-1ng/L group represented significant difference compared with the negative control group and the other groups at the same testing time. FCM: the 0.1 and 1ng/L group represented significant difference of the

G₀/G₁ phase cells ration compared with the negative control group. The 1ng/L group represented the significant difference with the 10 and 100ng/L group, while there was no significant difference between the 0.1 and 1ng/L group. The expression of p27Kip1 is stronger in all the TGF- β_2 groups, while the 0.1 and 1ng/L group show the significant difference compared with the negative control group.

• CONCLUSION: TGF- β_2 at the concentration of 0.1-1ng/L can inhibit the proliferation of bCECs significantly after 48h incubation, and it might be associated with the upgrading expression of p27Kip1.

• KEYWORDS: TGF- β_2 ; bovine corneal endothelial cells; inhibition; p27Kip1

Lu XL, Zhang MC. Inhibitory effect of transforming growth factor- β_2 on bovine corneal endothelial cells *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Gouji Yanke Zazhi)* 2009;9(6):1058-1060

摘要

目的: 观察体外不同浓度的转化生长因子 β_2 (transforming growth factor- β_2 , TGF- β_2) 对牛角膜内皮细胞 (bovine corneal endothelial cells, bCECs) 的抑制作用, 探讨其可能的分子机制。

方法: 培养新生小牛的角膜内皮细胞, 将第3代内皮细胞转移至96孔培养板, 实验分6组, 每组设定4个复孔。1, 2组分别为只含有培养液不含细胞和 TGF- β_2 的空白对照组, 和只含细胞和培养液不含 TGF- β_2 的阴性对照组, 3~6组分别加入含 0.1, 1, 10, 100ng/L TGF- β_2 的培养液。作用 24, 48, 72h 后用 MTT 检测法测定各孔吸光度 A 值。作用 48h 后, 用流式细胞检测仪对各组细胞周期进行检测。RT-PCR 法测定不同浓度的 TGF- β_2 组 p27Kip1 基因的表达情况。

结果: TGF- β_2 浓度为 0.1~1ng/L, 作用 24~72h, 能明显的使 bCECs 的吸光度发生改变, 作用 48h 抑制效果最明显。0.1 和 1ng/L 浓度组吸光度与阴性对照组相比有显著差异性, 作用 48h 可使 bCECs 的 G₀/G₁ 周期细胞所占比例与阴性组对比有显著差异, 其 p27Kip1 表达较其他组明显增强。

结论: 0.1~1ng/L TGF- β_2 作用 48h 对 bCECs 具有显著增殖抑制作用, 其抑制作用可能是通过上调细胞周期蛋白 p27 来实现的。

关键词: 转化生长因子 β_2 ; 牛角膜内皮细胞; 抑制; p27Kip1

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2009.06.013

陆秀兰, 张明昌. TGF- β_2 体外抑制牛角膜内皮细胞增殖的研究. 国际眼科杂志 2009;9(6):1058-1060

0 引言

角膜内皮细胞在维持角膜的正常功能, 尤其是其透明

性方面,起着至关重要的作用。传统观点认为,人角膜内皮细胞在胚胎期具有分裂增殖能力,在出生后将不再增殖,其损失只能通过周边细胞的扩大和移行来补偿。当角膜内皮细胞的损失超过其周边细胞的代偿能力时,就可能发生角膜内皮失代偿,引起角膜水肿,甚至会发生大泡性角膜病变。对于角膜内皮失代偿,目前的保守治疗方法主要是通过使用高渗性药物脱水治疗角膜水肿提高视力,其效果多不明显,失败后只能行角膜移植手术。目前移植术后排斥的问题尚未得到很好的解决。转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)家族是一组调节细胞生长和分化的蛋白质家族^[1],TGF- β_2 人眼房水中 TGF- β 的主要亚型。经研究证实,内源和外源性的 TGF- β_2 对角膜内皮细胞都有抑制增殖作用^[2]。本实验通过研究不同浓度 TGF- β_2 在不同作用时间下,对角膜内皮细胞的增殖抑制的影响,进一步研究对角膜内皮细胞增殖抑制影响的分子水平的相关因素,以期今后寻找阻断影响角膜内皮细胞增殖的相关药物,及进一步实验提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料 新生小牛(武汉吴家山奶牛场)宰杀后立即将牛眼取出,用无菌的 0.5U/L 庆大霉素及生理盐水混合溶液冲洗后,于 2h 内用冰瓶运回进行原代培养。胎牛血清(Gbico 公司),DMEM 培养基(Gbico 公司),胰蛋白酶(Sigma 公司),MTT(Sigma 公司),二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(广州新港化工有限公司),TGF- β_2 (武汉贝尔生物技术有限公司),ELX 自动酶标读数仪(美国 BD 公司),ELX-800 流式细胞仪(美国 BD 公司),倒置显微镜(日本 Olympus 公司),PCR 仪(德国 eppendorf 公司),电泳仪(北京六一厂)。RT-PCR 试剂盒及 PCR 反应试剂均购自武汉凌飞公司。PCR 扩增所用引物由上海英骏生物公司完成。

1.2 方法 用胰酶消化法进行原代培养,倒置相差显微镜观察细胞形态学特征。

1.2.1 细胞增殖的检测 取第 3~4 代 bCECs 悬液,调整细胞密度为 $5 \times 10^7/L$,均匀接种于 96 孔板中。分为 6 组,1 为空白组,2 为对照组,3~6 为实验组(TGF- β_2 0.1, 1, 10, 100ng/L 组),每组设 4 个复孔。1 组每孔只加不含细胞的培养液 200 μ L,其余 5 组每孔加入细胞悬液 200 μ L。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L CO₂ 恒温培养箱中培养 24h 后,弃去培养液及未贴壁细胞,实验组分别加入 0.1, 1, 10, 100ng/L TGF- β_2 的不含 FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L,空白组和对照组中加入等体积的培养液 200 μ L。培养 48h 后,每孔加入 5g/L 的 MTT 10mL,继续培养 3h,吸出培养液后每孔加入 DMSO 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 10min 后,漩涡混合器上充分震荡后于用自动酶标读数仪上检测 490nm 吸光度 A 值。通过 A 值计算各组的细胞抑制率。细胞抑制率(%) = 1 - (实验组吸光度 - 空白对照组吸光度) / (阴性对照组吸光度 - 空白对照组吸光度) \times 100%。重复 5 次。

1.2.2 细胞周期的检测 实验分 5 组,分别为阴性对照组及 TGF- β_2 0.1, 1, 10, 100ng/L 组。各组培养 48h 后,吸除培养基,用 PBS 液洗涤两遍,加入少量的 2.5g/L 胰蛋白酶消化。将培养瓶置于倒置显微镜下观察,见细胞间隙变大,细胞变圆时,吸除胰蛋白酶并以 PBS 液洗两遍后,加入适量 PBS 充分吹打,制备成单细胞悬液。将单细胞悬液移入离心管,1 200r/min,离心 5min,弃上清后,加 PBS 液悬浮细胞成单细胞悬液,快速注入 4 $^{\circ}$ C 的 700mL/L 乙

表 1 不同浓度的 TGF- β_2 对角膜内皮细胞的抑制率 (%)

分组	0.1ng/L	1ng/L	10ng/L	100ng/L
24h	61.45 \pm 0.03	58.65 \pm 0.03	40.69 \pm 0.04 ^a	37.60 \pm 0.04 ^a
48h	63.37 \pm 0.05 ^a	65.32 \pm 0.03 ^a	27.79 \pm 0.13 ^a	21.24 \pm 0.10 ^a
72h	60.02 \pm 0.03	49.51 \pm 0.03 ^a	26.20 \pm 0.07 ^a	18.25 \pm 0.05 ^a

^aP < 0.05 vs 低浓度组; ^aP < 0.05 vs 24, 72h 组

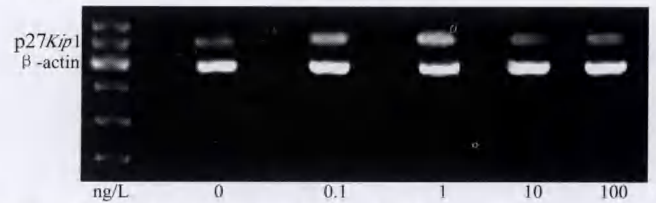


图 1 不同浓度 TGF- β_2 组 p27Kip 1 的表达

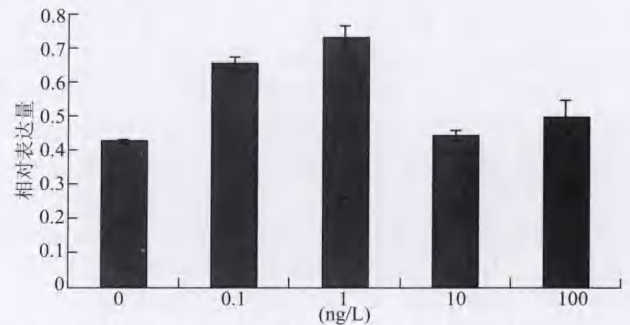


图 2 不同浓度 TGF- β_2 组 p27Kip 1 mRNA 的相对表达量

醇, -20 $^{\circ}$ C 过夜。将冰乙醇细胞悬液离心后弃酒精,再次以 PBS 溶液清洗两次,调整细胞密度为 $10^5/L$,后移入流式管内离心,弃上清,加入 PI 100 μ L 染色,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 20min 后,上流式细胞仪检测。重复 3 次。

1.2.3 p27Kip 1 的表达 参照 Trizol 试剂说明分别提取不同浓度 TGF- β_2 组及阴性对照组总 RNA,用紫外分光光度仪检测纯度及浓度,取总 RNA 2 μ g,用 RT-PCR 试剂盒进行反转录,PCR 扩增 p27Kip 1,同时扩增 β -actin 作为内参照。p27Kip 1 引物设计和 PCR 反应条件(上游引物序列 5'-AGCCAACAGAACAGAAAGAAA-3',下游引物序列 5'-AGTGGGATGAAGGCAGAC-3',扩增片段长 496bp;内参照牛 β -actin 上游引物为:5'-AGGACCTCTACGCCAACA-3',下游引物:5'-CCTTCACCGTCCAGTTT-3',扩增片段长 406bp。)PCR 反应条件 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 60s, 56 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 1.5min,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min 结束。PCR 产物 5 μ L + SybrGreen 荧光染料 2 μ L 混匀后,20g/L 的琼脂糖电泳 40min,凝胶成像系统摄像。重复 4 次。结果用 QuantiScan 软件进行分析。

统计学分析:SPSS 13.0 软件进行方差分析(S-N-K 检验)和 χ^2 分析。

2 结果

bCECs 形态:12h 左右开始细胞贴壁,细胞生长好,轮廓清晰,胞体透亮呈多边形。约 72h 后,细胞基本长满 25mL 瓶底,细胞成融合状态,轮廓欠清晰呈六边形及多边形 MTT 法显示:bCECs 在作用 24~72h 后,0.1~100ng/L TGF- β_2 均能使 bCECs 的吸光度发生改变,0.1, 1ng/L 组作用 48h,抑制效果最明显,作用 72h 抑制效果下降(表 1)。细胞周期:各浓度组均作用 48h 后,0.1, 1ng/L 组 G₀/G₁ 期细胞比例较其他组明显增加(P < 0.05),10ng/L 组与相邻低浓度组相比有统计学差异。10, 100ng/L 组与阴性对照

组相比无统计学意义($P > 0.05$)。p27Kip1的表达:作用48h后,0.1,1ng/L浓度组 p27Kip1的表达显著增加,条带最亮(图1)。10,100ng/L浓度组与阴性组对比无统计学差异。5组的分别如下:0.426 ± 0.005,0.652 ± 0.021,0.731 ± 0.032,0.443 ± 0.015和0.497 ± 0.050($P < 0.05$,图2)。

3 讨论

角膜内皮细胞在维持角膜正常功能,保持角膜的透明性方面起着至关重要的作用。人角膜内皮细胞在胚胎期具有分裂增殖能力,出生后将不再增殖。其损失只能通过周边内皮细胞的扩大和移行来代偿,而这种代偿作用是相当有限的。几乎所有进入眼前节的手术及很多眼病都可能损伤角膜内皮细胞,导致其密度下降或是形态不规则,损伤超过其周边细胞的代偿能力时,出现角膜内皮失代偿而导致角膜混浊。其治疗目前尚无良好的方法,因此对内皮细胞周期的调控机制及诱导其增殖的研究具有重要意义。转化生长因子 β 家族是一调节细胞生长和分化的蛋白质家族,在体内外具有调控细胞生长、调节细胞表型、抑制肿瘤生长等多种生物学功能。TGF- β_2 是人眼房水中TGF- β 的主要亚型,浓度约为0.41~2.24ng/L。实验证实,内源性和外源性的TGF- β_2 都对角膜内皮细胞有增殖抑制作用。p27Kip1是一个调控细胞周期的重要基因,作为非特异的CKI基因,它几乎可抑制所有cyclin/CDK复合物的激酶活性,这其中包括G₁期的限速因子cyclin E/CDK2和cyclin D/CDK4^[3]。Rivard等^[4]发现,p27Kip1通过与Cyclin D-CDK复合物结合抑制其活性使细胞停留在G₁/S期,提出p27Kip1可能是影响G₁/S限制点最直接的调控因子。p27Kip1对CDK的抑制作用可能在以下两方面:首先p27Kip1抑制与cyclin结合并被激活了的CDK的活性;其次p27Kip1也可直接作用使CDK不被激活^[5]。在房水中TGF- β_2 对内皮细胞生长的抑制作用是通过阻止p27Kip1降解并提高p27Kip1合成,从而阻止细胞进入S期来实现的^[6,7]。Funaki等^[8]实验发现高表达的Smad7可通过抑制p27Kip1的表达来阻断TGF- β_2 对角膜内皮细胞的抑制作用。Joyce等^[9]的研究也表明,随着角膜内皮细胞间的接触形成TGF- β_2 通过p27Kip1介导的级联效应抑制增殖。以上均提示p27Kip1高表达很可能是抑制角膜内皮细胞增殖的重要原因。Lee等^[10]对人角膜内皮细胞中p27Kip1的检测发现其表达明显高于角膜的其他部分组织。因此我们可以推断p27Kip1对于角膜内皮细胞周期的干预可能是使内皮细胞重新获得有丝分裂能力的关键。

我们通过MTT检测法测定TGF- β_2 在浓度为0.1~100ng/L之间,作用24~72h,均能明显的使bCECs的吸光

度A值发生改变。在同一时间段内,在浓度为0.1~1ng/L之间,抑制效果最为明显,其中,作用48h后,抑制效果最明显。而10~100ng/L浓度组与上一时间段比,抑制效果没有明显的差异。所以,我们可以推断,TGF- β_2 在0.1~1ng/L组浓度的作用下,对抑制bCECs的增殖呈时间剂量依赖性。作用48h后,0.1~1ng/L浓度组可使bCECs的G₀/G₁期细胞所占比例与阴性组有显著差异,并且p27Kip1的表达明显增强,而10~100ng/L浓度组与阴性组则无显著差异。因此,可以认为,TGF- β_2 在0.1~1ng/L浓度作用下,对bCECs的增殖有明显的抑制作用。将浓度提高到10~100ng/L,对细胞的抑制作用反而没有低浓度组明显,且其潜在的细胞毒性可能增加。我们的实验通过研究体外不同浓度的TGF- β_2 对牛角膜内皮细胞的抑制增殖作用,初步探讨其在体外作用的最佳浓度及时间及可能的分子机制,以期为后期信号通路实验和临床应用打下基础。

参考文献

- 1 陈蕾,邱大琳. 转化生长因子- β 作用研究进展. 医学理论与实践 2006;19(4):400-402
- 2 Chen K, Harris DL, Joyce NC. TGF-beta2 in aqueous humor suppresses S-phase entry in cultured corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(11):2513-2519
- 3 Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, et al. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27Kip1 and regulates cell cycle progression. *EMBO J* 2002; 21(3):3390-3401
- 4 Rivard NL, Allemain G, Bartek J, et al. Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppress quiescence (G0state) in fibroblasts. *J Biol Chem* 1996;271(31):18337-18341
- 5 Kuo MY, Hsu HY, Kok SH, et al. Prognostic role of p27Kip1 expression in oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol* 2002;38(2):172-178
- 6 Chen K, Harris DL, Joyce NC. TGF-beta2 in aqueous humor suppresses S-phase entry in cultured corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(11):2513-2519
- 7 Kim TY, Kim WI, Smith RE, et al. Differential activity of TGF-beta2 on the expression of p27Kip1 and Cdk4 in actively cycling and contact inhibited rabbit corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2001;7:261-270
- 8 Funaki T, Nakao A, Ebihara N, et al. Smad7 suppresses the inhibition effect of TGF-beta2 on corneal endothelial cell proliferation and accelerates corneal endothelial wound closure in vitro. *Cornea* 2003;22(2):153-159
- 9 Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF- β_2 . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(7):2152-2159
- 10 Lee HT, Kay EP. Regulatory role of PI 3-kinase on expression of Cdk4 and p27, nuclear localization of Cdk4, and phosphorylation of p27 in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(4):1521-1528